

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KELEN NAVARRO GARCIA WULFF

**PROBIÓTICOS A BASE DE *Bacillus* spp. NA CAMA E NA RAÇÃO DE FRANGOS
DE CORTE**

PALOTINA PR

2015

KELEN NAVARRO GARCIA WULFF

**PROBIÓTICOS A BASE DE *Bacillus* spp. NA CAMA E NA RAÇÃO DE FRANGOS
DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, área de concentração Patologia Animal, linha de pesquisa em Ornitopatologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edna Tereza de Lima

PALOTINA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

W961 Wulff, Kelen Navarro Garcia
Probióticos a base de *Bacillus* spp. na cama e
na ração de frangos de corte / Kelen Navarro Garcia
Wulff - Palotina, 2015.
60p.

Orientador: Edna Tereza de Lima
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal.

1. *Bacillus amyloliquefaciens*. 2. Microbiota.
3. Probiótico. I. Edna Tereza de Lima . II. Universidade
Federal do Paraná.

CDU 636.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIA ANIMAL
Código CAPES: 40001016077P6

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **KELEN NAVARRO GARCIA WULFF**, intitulada: "**PROBIÓTICOS A BASE DE *Bacillus spp.* NA CAMA E NA RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua *aprovação*, completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Mestre em CIÊNCIA ANIMAL**.

Palotina, 29 de Setembro de 2015.



Prof JOVANIR INES MULLER FERNANDES
(Presidente da Banca Examinadora)



Prof ALINE DE MARCO VIOTT



Prof LUCIANA KAZUE OTUTUMI

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Kelen Navarro Garcia Wulff, filha de Thomaz Garcia e Thereza Navarro Garcia, nascida no dia 09 de novembro de 1979 na cidade de São Paulo, estado de São Paulo, Brasil. Ingressou no ensino superior em 2001, na Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina como discente do curso de Medicina Veterinária. Em 2005 foi admitida na Perdigão S.A. como estagiária após processo seletivo no Laboratório de Patologia Animal na cidade de Videira/SC. Concluiu a graduação em 2005 e foi efetivada nesta empresa como Médica Veterinária no ano de 2006. No mesmo ano ingressou na Coopavel Cooperativa Agroindustrial atuando no fomento avícola. Em 2008 concluiu o curso de Pós Graduação *Lato Sensu* em Avicultura Industrial pelo Instituto Didatus de Ensino e Qualificação com duração de 375 horas. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina no ano de 2013, mesmo ano em que iniciou atividades de docência da Faculdade Assis Gurgacz (FAG) no curso de Medicina Veterinária. Em 2014 foi aprovada em processo seletivo na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus Toledo, como docente do colegiado de Medicina Veterinária. Atualmente é docente das disciplinas Produção de Aves, Laboratório Clínico e Zootecnia I nos colegiados de Medicina Veterinária e Agronomia da FAG e também responde pela coordenação do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da FAG. Ainda é colaboradora nas atividades laboratoriais do Hospital Veterinário, docente da disciplina Avicultura e Ornitopatologia no colegiado de Medicina Veterinária e coordenadora do curso de Pós Graduação *Lato Sensu* em Avicultura Industrial da PUC/PR Campus Toledo.

“Para ganhar conhecimento, adicione coisas todos os dias.
Para ganhar sabedoria, elimine coisas todos os dias.”

Lao Tsé

A ti, amor da minha vida, dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus... por guiar meus passos e me proteger.

Ao meu esposo, Alan Jones Wulff, por viabilizar essa conquista oferecendo todo o suporte e apoio necessário em meus momentos de ausência no lar. Por seu amor, compreensão, auxílio e presença em todas as etapas desse trabalho. Essa conquista também é sua.

A minha filha, Flávia, que mesmo não compreendendo plenamente os acontecimentos, aceitava os meus momentos de afastamento.

Aos meus pais, Thomaz (*in memoriam*) e Thereza, que plantaram a semente da busca pelo conhecimento e incentivo aos estudos.

A Universidade Federal do Paraná que proporcionou a estrutura física e corpo docente que permitiram a execução desse trabalho.

A professora Dr^a. Edna Tereza de Lima por sua confiança e orientação.

A professora Dr^a. Jovanir Fernandes por sua presença, amizade e valiosos conselhos, desde os primeiros anos de minha graduação, que persistiram ao longo do período desse mestrado.

A professora Dr^a. Aline Viott por ter aceito fazer parte de minha comissão de orientação e por seus importantes apontamentos durante as análises desses resultados.

A Anorita pela dedicação e preparo dos materiais necessários para as análises microbiológicas. A residentes do Laboratório de Microbiologia, Arielle Lara, e também aos estagiários pelo auxílio com as análises.

Aos alunos do Laboratório de Experimentação Avícola (LEA) que colaboraram com esse experimento e especialmente: Jonas Layter, Joice Schmidt, Alessandro

Ferrarini e Krishna Marques, que executaram grande parte dos cuidados com as aves durante o experimento.

A Coopavel Cooperativa Agroindustrial, especialmente ao Srs. Jair Luiz Casarotto e Renato Camilo Pasqual por seu apoio e incentivo desde os primeiros momentos desse trabalho.

A Faculdade Assis Gurgacz – FAG, especialmente ao Sr. Rennê Gomiero, pelo apoio e compreensão nos momentos necessários.

Aos colegas da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC PR) pelo incentivo.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a conclusão desse trabalho.

A C.VALE, pela disponibilização das aves e ração utilizada no experimento.

A todos que, de uma forma ou outra torceram, colaboraram e contribuíram para que esse trabalho fosse possível, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O experimento foi conduzido para avaliar os efeitos de cepas probióticas de *Bacillus amyloliquefaciens* e uma composição de *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyoi* em sua capacidade de colonização do intestino e da cama de frangos de corte e sua interferência com a microbiota das aves. Também foram avaliados os aspectos morfométricos das vilosidades do duodeno das aves e o desempenho zootécnico (ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar). Um total de 300 pintainhos de frangos de corte, machos de um dia de idade (Cobb 500 *Slow*) foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos com quatro repetições: controle positivo, probiótico cama, probiótico ração e cama, probiótico ração e controle comercial. A cada sete dias foram avaliados o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar e duas aves de cada repetição foram abatidas para determinação da contagem de *Bacillus* spp. e *Lactobacillus* spp. nas fezes coletadas diretamente do intestino. Nas mesmas idades foram coletadas amostras da maravalha das gaiolas para determinação da contagem de *Bacillus* spp. Aos 14 e 28 dias foram coletados segmentos de duodeno das aves abatidas para avaliação de morfometria intestinal (altura de vilos, profundidade de criptas, relação vilo:cripta e área de absorção intestinal). Não houve alteração nas características da microbiota (contagem de *Lactobacillus* spp.) e tampouco no desempenho zootécnico entre os tratamentos. No entanto, o grupo controle comercial apresentou resultados positivos, como melhor colonização intestinal e maior presença das cepas probióticas na cama. Esses efeitos podem, em situações onde ocorra desafio, resultar em um melhor desempenho para as aves desafiadas.

Palavras chave: Microbiota. Probiótico. Cama. *Bacillus subtilis*. *Bacillus toyoi*. *Bacillus amyloliquefaciens*.

ABSTRACT

The experiment was conducted to evaluate the effects of probiotic strains of *Bacillus amyloliquefaciens* and a blend of *Bacillus subtilis* and *Bacillus toyoi* in ability to colonize the broiler and litter and its interference with the microbiota of birds. Also evaluated the morphometric aspects of the villi of the duodenum of birds and performance (body weight gain, feed intake and feed conversion ratio). A total of 300 broiler chicks, males one-day-old (Cobb 500 Slow) were distributed in a completely randomized assigned with five treatments with four replicates: Positive control, Probiotic litter, Probiotic feed + litter, Probiotic feed and commercial control. Every seven days were evaluated body weight gain, feed intake and feed conversion ratio and two birds per replicate were slaughtered for determination of count of *Bacillus* spp and *Lactobacillus* spp. in faeces that was collected directly from the intestine. In the same ages litter samples were collected from the cages to determine the count *Bacillus* spp. At 14 and 28 days were collected from birds slaughtered duodenum segment for evaluation of intestinal morphometry (villus height, crypt depth, villus;crypt ratio and intestinal absorption area). There was no change in microbiota characteristics (*Lactobacillus* spp. count), on the performance between treatments. However, the commercial control group showed positive results, such as better intestinal colonization and greater presence of probiotic strains in bed. These effects can get in other situations where occur challenge, providing better performance for the challenged birds.

Key words: Microbiota. Probiotic. Litter. *Bacillus subtilis*. *Bacillus toyoi*. *Bacillus amyloliquefaciens*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Contagens de *Bacillus* spp. em fezes e cama de frangos de corte e *Lactobacillus* spp. Em fezes, em função do tratamento e do tempo (Log_{10}/g). 40

Tabela 2 . Média das contagens de *Bacillus* spp. Nos dias sete, 14, 21 e 28, isolada de fezes de frangos submetidos a diferentes tratamentos com probióticos (Log_{10}/g). 41

Tabela 3. Coeficientes de correlação de *Pearson* para contagem de *Bacillus* spp. Nas fezes, contagem de *Bacillus* spp. Na cama e contagem de *Lactobacillus* spp. Nas fezes (Log_{10}/g). 49

Tabela 4. Comprimento de vilo, profundidade de cripta, relação vilo:cripta (V:C) e área de absorção (AA) da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 14 e 28 dias de idade 50

Tabela 5. Desempenho produtivo semanal de frangos de corte suplementados com probiótico na ração ou na cama no período de um a 28 dias de idade 52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Baterias de gaiolas utilizadas durante o experimento, sendo que cada bateria possuía quatro gaiolas individuais todas forradas com 15cm de maravalha.	32
Figura 2. Fornecimento de água. Notar a presença de dois bebedouros tipo nipple e um bebedouro manual.	33
Figura 3. Placas de cultivo com meio TSA. Figura A: Presença de colônias de <i>Bacillus</i> spp. em diluições seriadas de amostra de fezes do grupo Controle comercial. Figura B: Ausência de colônias de <i>Bacillus</i> spp. em série de diluições de amostra de fezes do grupo Controle positivo.	35
Figura 4. Corte histológico de duodeno de frangos de corte aos 14 dias de idade. Figura A: Grupo Probiótico cama; Figura B: Grupo Controle positivo. (Coloração HE, Objetiva 10X).	38
Figura 5 – Contagem de <i>Bacillus</i> spp. em fezes de frangos de corte do grupo Controle comercial em função da idade ($R^2=0,6238$).....	42
Figura 6 - Contagens de colônias de <i>Bacillus</i> spp. em Log10/g em cama de frangos de corte aos sete, 14, 21 e 28 dias nos diferentes tratamentos testados.	45
Figura 7 - Contagens de colônias de <i>Lactobacillus</i> spp. em fezes de frangos de corte aos sete, 14, 21 e 28 dias sob diferentes tratamentos com probiotico a base de <i>Bacillus</i> sp (Log10/g).	47
Figura 8 – Contagem de <i>Lactobacillus</i> spp. em fezes de frangos de corte ($R^2=0,3936$).	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL EM AVES	14
2.1.1 Desenvolvimento da microbiota	14
2.1.2 Composição da microbiota	16
2.1.3 Funções da microbiota	17
2.2 PROBIÓTICOS	19
2.2.1 Características dos probióticos	20
2.2.2 Eficácia e mecanismo de ação dos probióticos	22
2.2.3 <i>Bacillus</i> spp.	24
2.2.4. Utilização de probióticos na avicultura	25
3. OBJETIVOS	29
3.1. GERAL.....	29
3.2. ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. LOCAL	30
4.2. AVES.....	30
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
4.4. AMBIENTE.....	31
4.5 CONTAGEM DE <i>Bacillus</i> spp. EM INTESTINO	34
4.6 CONTAGEM DE <i>Bacillus</i> spp. NA CAMA.....	35
4.7 CONTAGEM DE <i>Lactobacillus</i> spp. NO INTESTINO	36
4.8 MORFOMETRIA INTESTINAL E ÁREA DE ABSORÇÃO DA MUCOSA DO DUODENO	36
4.9 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS.....	38
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. CONTAGEM BACTERIANA.....	40
5.2. MORFOMETRIA INTESTINAL	49
5.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO	51
6. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

A avicultura para o Brasil é um setor de grande importância tanto sob o aspecto social quanto econômico. A indústria avícola emprega direta e indiretamente mais de 3,6 milhões de pessoas no país e movimenta quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional atingindo em 2013 a produção de 12,3 milhões de toneladas de carne de frango. Parte dessa produção foi consumida no mercado interno e 31,6% foi destinada à exportação. Nesse período foram embarcados quase quatro milhões de toneladas de carne de frango nos portos brasileiros para mais de 160 nações diferentes o que torna o país o maior exportador mundial, posição atingida em 2004 e mantida até os dias atuais (UBABEF, 2015).

Para manter tamanha produtividade e competitividade, a produção nacional tem buscado seu alicerce em tecnificação que une todos os segmentos da cadeia produtiva, desde a acentuada seleção genética das aves reprodutoras, passando pelos programas de alimentação com excelente equilíbrio nutricional, a sanidade e também as melhorias das instalações nas unidades de criação, como a etapa de incubação artificial. Toda essa tecnologia propicia o volume de aves necessárias para a manutenção da cadeia avícola e é indispensável para o sucesso da produção, no entanto, alguns processos retardam o contato do pintainho recém eclodido com o ambiente, ponto chave para o estabelecimento de sua microbiota.

A colonização e estabelecimento da microbiota intestinal em aves inicia nos primeiros momentos pós eclosão e leva cerca de 40 dias para sua formação. Ela desempenha papel fundamental na saúde do hospedeiro e tem relação direta com a imunidade das mucosas e a capacidade de resposta imunológica do indivíduo. Outra função importante é o controle de agentes bacterianos intestinais patogênicos, especialmente em pintainhos, utilizando estratégias como exclusão competitiva e a manutenção de um ambiente inóspito para patógenos (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010; CHAMBERS e GONG, 2011).

Vários produtos têm sido utilizados com o intuito de modular a microbiota intestinal de aves, tendo destaque nas últimas décadas os antimicrobianos como

aditivos melhoradores de desempenho. No entanto, com a proibição da utilização de antimicrobianos melhoradores de desempenho na União Européia (EU) desde 2006 e a maior restrição de uso pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento brasileiro (MAPA) desde 2009, a busca por produtos alternativos efetivos que possam colaborar para melhorar a microbiota das aves foi intensificada (EUROPEAN COMMUNITIES, 2003; BRASIL, 2009).

Entre as opções de aditivos melhoradores de desempenho zootécnico atuantes na microbiota intestinal tem-se probióticos, prebióticos, enzimas e ácidos orgânicos (BRASIL, 2009). Os probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). De maneira geral, atuam por meio da modulação da microbiota fazendo exclusão competitiva, aderindo a sítios de ação no intestino e competição por nutrientes. Produzem substâncias com atividade antibacteriana como bacteriocinas e ácidos orgânicos e também promovem imunomodulação (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010; CHAMBERS e GONG, 2011).

Os gêneros mais utilizados como probióticos, incorporados na alimentação das aves são os *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Saccharomyces* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Bacillus* spp. (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010). Os *Bacillus* spp. possuem uma característica que os diferencia dos demais gêneros que é sua capacidade de esporulação e dessa maneira eles se tornam mais resistentes no ambiente (CASULA e CUTTING, 2002). Essa característica permitiu que outras formas de aplicações desse probiótico fossem avaliadas, como nos trabalhos de Roll et al. (2008), os quais observaram que a semeadura da cama com cepas de *Bacillus subtilis* reduziu a contagem de enterobactérias em cama de aviário.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROBIOTA INTESTINAL EM AVES

A microbiota intestinal das aves é constituída por uma população heterogênea de bactérias, bastante complexa e dinâmica, constituída por inúmeras espécies que vivem em equilíbrio entre si e com o hospedeiro. Sua composição é feita na maioria por bactérias anaeróbias facultativas produtoras de ácido láctico e bactérias anaeróbias estritas. A presença dessa população em equilíbrio é necessária e benéfica para a qualidade de vida e bem estar do hospedeiro (RAMOS, 2009; SILVA, 2009).

Ela é estabelecida logo após o nascimento e sua composição é definida por fatores como o genótipo do hospedeiro, o tipo de alimentação, a estrutura intestinal do hospedeiro e os microrganismos com os quais o pintainho terá contato nos primeiros momentos de sua vida pós eclosão. Esse processo de colonização envolve uma sucessão de eventos, sendo que o contato com o ambiente e com outros indivíduos da mesma espécie é o mais importante. Isso resulta em uma microbiota individual e única e sua biodiversidade continua, ao longo da vida da ave, a ser influenciada por fatores como a dieta, morfologia intestinal e utilização de antibióticos (O'HARA e SHANAHAN, 2006; APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006; NOVERR e HUFFNAGLE, 2004; GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI; 2010).

2.1.1 Desenvolvimento da microbiota

No ambiente natural as aves recém nascidas ficam expostas as bactérias a partir do momento da eclosão. O primeiro inóculo recebido pelas aves é fornecido pela própria casca do ovo, que é fortemente povoada por bactérias do trato intestinal materno e também de bactérias do ambiente. Porém, no processo de incubação artificial é necessário que todo o ambiente, inclusive os próprios ovos, passem por processos de desinfecção com o intuito de evitar a contaminação por microrganismos patogênicos. Essa medida habitual para o manejo sanitário das aves dificulta o acesso precoce do neonato aos microrganismos colonizadores,

retardando o desenvolvimento da microbiota. Isso se torna relevante, pois o efeito do primeiro inóculo pode influenciar toda a vida do frango, orientando o desenvolvimento do sistema imunitário (tolerância imunológica), a microbiota normal e a fisiologia intestinal de frangos de corte. Há evidências que as bactérias pioneiras podem modular a expressão gênica no hospedeiro de maneira a criar um ambiente favorável para si e assim prevenir o crescimento de outras bactérias introduzidas posteriormente no ecossistema (APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006; JURICOVA et al., 2012; O'HARA e SHANAHAN, 2006).

Sendo então a colonização intestinal totalmente dependente de recursos ambientais e considerando o atual ambiente artificial de criação das aves, o primeiro contato da ave com os microrganismos colonizadores pode incluir cepas aleatórias e não específicas. Além disso, se um microrganismo patogênico presente no ambiente invadir o intestino de pintainhos recém eclodidos ele pode se aderir a um nicho disponível e multiplicar-se irrestritamente. Além disso, as aves são relativamente imunoincompetentes até a terceira semana de vida, o que as torna ainda mais suscetíveis a um potencial patógeno (LEE et al., 2010; APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006; JURICOVA et al., 2012; LEE et al., 2010).

Os microrganismos colonizadores iniciais crescem exponencialmente nos primeiros dias pós eclosão. Porções do íleo e ceco, inicialmente estéreis, atingem valores de 10^8 a 10^{10} bactérias por grama de digesta em um dia. Isso é possível devido ao ambiente altamente rico em nutrientes fornecidos a partir do resíduo do conteúdo do saco vitelino. No entanto, pode-se afirmar que o equilíbrio nesse ecossistema microbiano precisa de um tempo maior para ocorrer, uma vez que o intestino delgado tem sua microbiota estabelecida e equilibrada em torno de duas semanas, enquanto que o ceco, com a microbiota composta principalmente por anaeróbios estritos ocorre após 30 dias de vida (LEE et al., 2010; APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006).

O completo desenvolvimento e equilíbrio da microbiota nas aves ocorre próximo aos 40 dias de idade, onde estima-se que alcance uma quantidade dez vezes maior em bactérias que em células somáticas, chegando ao número de cerca de 10^{13} bactérias por grama de digesta na microbiota do trato gastroentérico. Após a fase de colonização inicial, ocorre uma etapa de maturação que é caracterizada

por uma baixa taxa de crescimento, que acompanha a taxa de passagem da digesta, e por uma seleção gradual de bactérias que mais eficientemente se adaptam às condições locais (CHAMBERS e GONG, 2011; APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006).

2.1.2 Composição da microbiota

A microbiota varia de acordo com o segmento intestinal, no entanto, poucas ainda são conhecidas. As técnicas para identificação como cultura, isolamento e identificação bacteriológica só são efetivos para microrganismos que tem a capacidade de serem cultivados em meios artificiais e mais de 90% dos constituintes da microbiota das aves não tem essa capacidade. Portanto, estudos baseados nessas técnicas podem subestimar significativamente a diversidade desses microrganismos (APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006; PEDROSO, 2003; CHAMBERS e GONG, 2011; O'HARA e SHANAHAN, 2006).

Já com o advento de técnicas moleculares simples, como a utilização de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar o rDNA 16S permitem resultados confiáveis para a detecção de microrganismos do trato intestinal. Moléculas com tamanhos semelhantes identificadas pelo PCR podem ser diferenciadas em sua composição de citosina (C) e guanina (G) com a utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Porém essa técnica apenas captura a diversidade e pode sugerir gêneros, no entanto, não revela a identidade individual das espécies bacterianas ali presentes e ainda pode ser limitada devido ao tipo de primer utilizado, que precisa ser de ampla cobertura para as mais variadas espécies bacterianas (PEDROSO, 2003; APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006; CHAMBERS e GONG, 2011).

Por isso, a maioria dos mais de 2000 microrganismos descobertos pela análise do sequenciamento genético do rDNA 16S ainda não foram identificados. Nos cecos, de aproximadamente 640 espécies representando 140 gêneros bacterianos, apenas 10% foram identificados. Portanto, até o momento existem muitos questionamentos a respeito da composição e funções dos microrganismos da microbiota das aves. No entanto, algumas informações estão bastante consolidadas e sabe-se que a população bacteriana no intestino delgado das aves é composta em

sua maioria por *Lactobacillus* spp., seguido por *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia* spp., *Streptococcus* e outros microrganismos variáveis. Já nos cecos, a maioria é composta por bactérias do gênero *Clostridium* spp. (LEE et al., 2010; PEDROSO, 2003; APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006; CHAMBERS e GONG, 2011).

2.1.3 Funções da microbiota

Sabe-se que a microbiota assume importância fundamental no desempenho e na manutenção da saúde da ave. Quando equilibrada, constitui uma barreira eficaz contra a colonização de patógenos, produz substratos metabólicos (como vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta) e estimula o sistema imune de forma não inflamatória. Pode ser considerada como um “órgão metabolicamente ativo” com uma vasta biodiversidade e metabolismo ativo (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010).

Ainda que os microrganismos compitam por nutrientes, sua complexa atividade metabólica recupera uma quantidade valiosa de substratos e energia para ser utilizada pelo hospedeiro, porém esse efeito é difícil de ser quantificado. No entanto, em condições onde ocorre o desequilíbrio no ambiente intestinal, como em disbacterioses ou enterites inespecíficas, observa-se clara perda no desempenho zootécnico, impactando na eficiência alimentar, viabilidade e ganho de peso, além de facilitar o acesso de microrganismos patogênicos. Nesses desequilíbrios ocorre aumento da espessura da mucosa intestinal, diminuição de vilos, maior profundidade das criptas e rápida passagem da digesta o que prejudica a absorção de nutrientes (SILVA, 2009; DONOGHUE et al., 2006).

A microbiota colabora com o desenvolvimento intestinal produzindo ácidos graxos de cadeia curta por meio da fermentação (principalmente ácido láctico), que reduzem o pH e criam um ambiente propício para sua auto renovação. Essa situação, além de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis, também estimula o crescimento de tecidos intestinais com a proliferação de enterócitos, favorecendo a manutenção da integridade intestinal e estimulando a total capacidade de absorção de nutrientes pelas aves (SILVA, 2009).

O efeito de exclusão competitiva, que é o fenômeno associado aos primeiros organismos que se estabelecem como uma flora dificultarem o desenvolvimento de novos microrganismos, é um dos benefícios mais evidentes da microbiota. Por esses princípios ecológicos a presença de um microrganismo comensal impedirá a existência de um nicho para um microrganismo patogênico. Sabe-se que a transferência de microbiota de galinhas livre de *Salmonella* spp. impediu a colonização intestinal de pintainhos por este agente (NOVERR e HUFFNAGLE, 2004; CHAMBERS e GONG, 2011). Porém evidências demonstram que o papel benéfico da microbiota é muito mais amplo, principalmente como regulador do sistema imune (NOVERR e HUFFNAGLE, 2004; LEE et al. 2010; O'HARA e SHANAHAN, 2006).

Uma maneira eficaz de compreender a articulação entre microbiota e o sistema imune do hospedeiro é o estudo de animais axênicos, ou germ-free. A ausência do relacionamento entre hospedeiro e microrganismos não permite o desenvolvimento satisfatório do sistema imune, uma vez que é por meio desta relação que ocorrerá a distinção entre microrganismos comensais ou patogênicos. Esses indivíduos demonstram uma série de falhas na função imunológica e possuem uma maior suscetibilidade a infecções intestinais, pois tem a imunidade de mucosa prejudicada e não são capazes de gerar uma resposta imune satisfatória até o reestabelecimento da microbiota. Nesses indivíduos as Placas de Peyer são pequenas, ocorre uma menor vascularização, menor atividade de enzimas digestivas, a quantidade de linfócitos intra-epiteliais são menores assim como os níveis de IgA (NOVERR e HUFFNAGLE, 2004; LEE et al. 2010; O'HARA e SHANAHAN, 2006).

A diferenciação pelo sistema imune entre microrganismos comensais e patogênicos envolve uma sequência de eventos bastante complexa com a participação de moléculas sinalizadoras que ainda não é totalmente conhecida. Células especializadas no epitélio intestinal, chamadas células M captam e transportam antígenos a células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, que subsequentemente processam e apresentam esses antígenos às células T. As células dendríticas participam na modulação da resposta em inflamatória ou tolerante, pois de acordo com o tipo de citocinas e quimiocinas

liberadas pelas células dendríticas ocorre a diferenciação entre células T efetoras ou reguladoras (O'HARA e SHANAHAN, 2006). Noverr e Huffnagle (2006) relatam que a presença de *Lactobacillus* spp. na microbiota intestinal dificultam a maturação de células dendríticas na mucosa (e por sua vez o tipo de citocina liberada) e esse processo de maturação está diretamente relacionado com a diferenciação de células T CD4+ em efetoras (Th1 - celular ou Th2 - humoral) ou células T reguladoras, que mediam a tolerância imunológica.

Explorando as importantes funções da microbiota infere-se que sua manipulação de forma a aprimorar seus componentes benéficos represente uma estratégia terapêutica promissora. Diferentes métodos podem ser utilizados com o intuito de modular a microbiota intestinal. A utilização de agentes antimicrobianos, microrganismos de exclusão competitiva, simbióticos, prebióticos e probióticos são opções disponíveis. Quando administrados em aves recém nascidas, antes da fase de maturação da microbiota, podem trazer resultados promissores. Os principais efeitos destes aditivos são o aumento na resistência à colonização por bactérias patogênicas e melhora na resposta imune local do intestino resultando em uma carga patogênica reduzida, uma melhora no status sanitário e um menor risco de transmissão de patógenos aos produtos avícolas (O'HARA e SHANAHAN, 2006; GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010).

2.2 PROBIÓTICOS

Por definição, probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à microbiota intestinal e a saúde do hospedeiro (LILLY e STILLWELL, 1965, citado por LI, ZHAO e WANG, 2009). Os efeitos benéficos demonstrados pelos probióticos incluem a regulação da homeostase microbiana intestinal, a estabilização da função de barreira gastrointestinal, a expressão de bacteriocinas, a atividade enzimática indutora de absorção e nutrição, os efeitos imunomoduladores, a inibição de enzimas pró-carcinogênicas e a interferência na capacidade de colonização de microrganismos patogênicos (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010).

O interesse na utilização desses produtos é crescente desde o banimento no uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho na União Europeia em 2006. No cenário nacional, embora ainda permitidos, há um rígido controle na utilização desse tipo de aditivo. Essa restrição se deve a preocupação mundial sobre o desenvolvimento de resistência antimicrobiana e sobre a transferência de genes de resistência dos microrganismos da microbiota animal para microrganismos com potencial patogênico para a saúde pública (EUROPEAN COMMUNITIES, 2003; BRASIL, 2009; GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010).

2.2.1 Características dos probióticos

Para que uma cepa do microrganismo seja considerada probiótica é necessário que sejam demonstrados seus efeitos benéficos e também seja inócuo quando administrado. Microrganismos utilizados com essa finalidade para consumo humano precisam ser avaliados quanto a sua segurança e devem ser regulamentados pelos órgão governamentais competentes, como o Food and Drug Administration (FDA) americano, o European Food Safety Authority (EFSA) europeu e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) brasileira. São levados em consideração critérios como o histórico de segurança de sua utilização na indústria de alimentos e a aquisição de resistência a antibióticos ou mecanismos de virulência (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010). Não existe regulamentação específica para esses produtos, quando destinados a alimentação animal, na legislação nacional.

As características promotoras de saúde desejadas e os critérios de segurança esperados de um probiótico estão listados abaixo: (GUARNER et al., 2008; GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010).

- 1) Não apresentar toxicidade e ser apatogênico;
- 2) Correta identificação taxonômica;
- 3) Capaz de habitar a microbiota da espécie alvo;
- 4) Habilidade de exercer no mínimo uma característica promotora de saúde comprovada cientificamente;

- 5) Geneticamente estável;
- 6) Manter a estabilidade das características desejáveis da cepa durante o processamento, armazenamento e administração;
- 7) Viabilidade em grandes populações;
- 8) Características organolépticas e tecnológicas desejáveis quando incluídas no processamento industrial;
- 9) Sobreviver, colonizar e ser metabolicamente ativo no sítio alvo, o que envolve:
 - a) Resistir ao ambiente gástrico e a bile
 - b) Persistência no trato gastrointestinal
 - c) Aderir ao epitélio ou muco
 - d) Competir com a microbiota
 - e) Produzir substâncias antimicrobianas
 - f) Antagonizar bactérias patogênicas
 - g) Modulação nas respostas imunes

Eles podem estar incluídos em uma infinidade de produtos como alimentos, drogas e aditivos, de forma a saturar os sítios receptores do epitélio intestinal. É necessário que tenham a habilidade de aderir ao ambiente intestinal para que ali se desenvolvam de maneira que não sejam removidos por movimentos peristálticos. Espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Bacillus* são os microrganismos mais comumente utilizados, mas a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e algumas cepas de *E. coli* também apresentam essas características (SILVA, 2009; LI, ZHAO e WANG, 2009; GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010).

Para garantir a eficiência de um produto, há a necessidade de avaliar a dosagem que foi utilizada, pois os efeitos podem não ser os mesmos em dosagens inferiores. O tipo do veículo em que os microrganismos estão suspensos também precisa ser levado em conta, pois em algumas situações pode haver diminuição da viabilidade da cepa. Da mesma maneira, o tempo em que ela permanece viável na mesma concentração no veículo precisa ser considerado para estabelecer um prazo de validade para o produto (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010; GUARNER et al., 2008).

Diversos estudos demonstraram benefícios na utilização de probióticos, contudo deve ser levado em consideração que os efeitos benéficos descritos só podem ser associados às cepas testadas e não a qualquer microrganismo que aparentemente apresente essas características. Dessa forma os efeitos benéficos só podem ser definidos após uma sucessão de estudos e pesquisas do microrganismo específico, da mesma forma que estudos sobre determinadas cepas não podem ser utilizados como evidência para sustentar os efeitos de cepas não testadas (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010; GUARNER et al., 2008).

2.2.2 Eficácia e mecanismo de ação dos probióticos

Avaliações *in vitro* demonstram as principais atividades funcionais necessárias a uma cepa microbiana probiótica, como a possível sobrevivência no trato gastrointestinal, atividade antimicrobiana, estudos de adesão e sensibilidade ao antimicrobianos. No entanto *in vivo*, a eficácia pode sofrer outras interferências, como a variação conforme a duração da administração e da idade do animal, pois durante o início da vida do indivíduo o padrão de colonização intestinal é instável e a integração de novos agentes (patogênicos ou não) com a microbiota é facilitada (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010; GUARNER et al., 2008; O'HARA e SHANAHAN, 2006).

O mecanismo de ação dos probióticos, embora não esteja totalmente elucidado, envolve a regulação da microbiota e se assemelha a função desta do hospedeiro. Quando algum fator leva a perda na barreira de integridade intestinal e desequilíbrio da microbiota, ocorre um aumento progressivo da permeabilidade da mucosa. Microrganismos potencialmente patogênicos presentes nesse ecossistema passam então a produzir toxinas e outras classes de substâncias, como mucinases, adesinas e invasinas que interferem no metabolismo epitelial o que desenvolve um processo inflamatório descontrolado e patológico. Esse evento por sua vez, torna o ambiente pouco favorável para a manutenção dos microrganismos benéficos, como lactobacilos e bifidobactérias (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010). A inclusão de forma contínua na dieta de microrganismos benéficos exógenos, probióticos,

induzem a estabilização da função da barreira gastrointestinal (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010; CHAMBERS e GONG, 2011; LEE et al., 2010).

Os probióticos conferem proteção aos vilos e a superfície absorptiva intestinal contra toxinas irritantes produzidas por microrganismos patogênicos. A competição com patógenos na ocupação de sítios de aderência nas vilosidades impedem a ação deletéria na parede intestinal por meio da exclusão competitiva. As fímbrias das bactérias probióticas reconhecem oligossacarídeos específicos dos sítios de ligação da parede intestinal e seu local de aderência é variável, sendo que algumas se unem ao glicocalix no ápice dos vilos enquanto outras se alojam nas criptas. Uma vez aderidas a mucosa intestinal, produzem substâncias que favorecem sua manutenção e conferem um ambiente inóspito para outras espécies (LEE et al., 2010; FURLAN, MACARI E LUQUETTI, 2004).

A produção ou liberação de compostos com característica inibitória ou destrutiva de microrganismos patogênicos é outra característica importante de alguns microrganismos probióticos. Fazem parte desses compostos, bacteriocinas e ácidos orgânicos. Essa produção aumenta significativamente a capacidade dos probióticos competirem por nichos de fixação na mucosa intestinal (LEE et al., 2010; JOEGER, 2003).

As bacteriocinas, substâncias proteicas produzidas por algumas cepas, tem ação local e atuam na permeabilidade de membrana da bactéria levando a sua desestabilização e consequente morte, possuindo portanto, efeito antibiótico. As bactérias ácido lácticas produzem nisina, diplococcina, lactocidina, bulgaricina e reuterina, com ação em bactérias Gram negativas e Gram positivas (JOEGER, 2003; FERREIRA e ASTOLFI-FERREIRA, 2006).

Os ácidos orgânicos são produzidos por bactérias probióticas a partir de resíduos não utilizados da dieta do hospedeiro presente na luz intestinal. São reconhecidos o ácido propiônico, acético, butírico e láctico que atuam na inibição de crescimento de microrganismos patogênicos através da redução do pH do meio intestinal. A acidificação do meio também favorece a manutenção das bactérias ácido-lácticas (FURLAN, MACARI E LUQUETTI, et al., 2004).

Com a estabilização do meio ácido e a multiplicação de bactérias ácido-láticas os nutrientes disponíveis são destinados ao metabolismo destas e ficam escassos para a multiplicação de microrganismos patogênicos, limitando sua sobrevivência (JOEGER, 2003; FERREIRA e ASTOLFI-FERREIRA, 2006). LEE et al. (2010) relataram que a inclusão de probióticos a base de espécies de *Lactobacillus* e *Bacillus* reduziu a quantidade de microrganismos entéricos prejudiciais (*Escherichia coli* e *Clostridium* spp.) e aumentaram os níveis de bactérias benéficas produtoras de ácido láctico na microbiota normal.

De maneira similar a que a microbiota modula o sistema imune, as cepas probióticas influenciam o sistema imune de diversas maneiras. Estão relacionadas ao aumento no número de anticorpos, ativação de macrófagos, aumento de células T e na imunidade celular, redução na apoptose de células epiteliais, na interação entre células dendríticas e células T, assim como interferem na produção de citocinas, estimulando a produção de algumas citocinas regulatórias e redução na síntese de outras citocinas pró - inflamatórias (LEE et al., 2010).

2.2.3 *Bacillus* spp.

Bacillus spp. são bactérias Gram-positivas, em forma de bacilo. É um gênero bacteriano ubíquo na natureza e bastante heterogêneo possuindo espécies nocivas, inócuas e benéficas à saúde. Sob condições estressantes esporulam e podem permanecer no ambiente indefinidamente (KONEMANN et al., 2001).

Esporos de *Bacillus* spp. são amplamente difundidos como probióticos e agentes de exclusão competitiva em humanos e animais, o que os diferencia das demais espécies de microrganismos utilizados que estão em sua forma vegetativa. A forma esporulada da bactéria tem a capacidade de resistir ao baixo pH do estômago e atingir o intestino em grandes quantidades, onde germinam, sendo então eliminados no conteúdo fecal. Uma vez no ambiente intestinal, eles colonizam e se multiplicam, promovendo assim a exclusão competitiva e o efeito probiótico (CASULA e CUTTING, 2002). Trabalhos demonstrando o mecanismo de ação desse gênero bacteriano evidenciaram o efeito imunoestimulante, além de melhorar a

performance e digestibilidade de nutrientes em frangos, modular a microbiota e inibir a ação de patógenos (GREEN et al., 1999; AHMED et al., 2014).

2.2.4. Utilização de probióticos na avicultura

A necessidade de aditivos que pudessem substituir de maneira eficiente os antimicrobianos melhoradores de desempenho (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010) levou a diversas pesquisas com diferentes cepas probióticas. Avaliações quanto aos efeitos no desempenho zootécnico, estímulo do sistema imune e prevenção da infecção por microrganismos patogênicos são os mais prevalentes. No entanto, os resultados desses estudos não foram unânimes quanto aos seus benefícios (REYES, PÉRES e PÉRES, 2000; ESTRADA, WILKIE e DREW et al., 2001; PELICANO et al., 2003; BLAIR et al., 2004; ANDREATTI FILHO et al., 2007; LI, ZHAO e WANG, 2009; GRACIA et al., 2009; TRALDI et al.; 2009; LEANDRO et al.; 2010; LIN et al., 2011; RAMOS et al., 2011; LOURENÇO et al., 2012; DOMINGUES et al., 2014; AHMED et al., 2014; LEI, RU e ZHANG, 2014).

Alguns pesquisadores demonstraram efeitos nulos ou até negativos no uso de probióticos. REYES, PÉRES e PÉRES (2000) não evidenciaram melhora no desempenho de frangos suplementados com um probiótico contendo cepas ácido-láticas mistas e ESTRADA, WILKIE e DREW et al. (2001) constataram que a administração de *Bifidobacterium bifidum* não apresentou efeitos positivos no desempenho zootécnico de frangos.

Ramos et al. (2011) avaliaram o desempenho produtivo e a histomorfometria de segmentos de intestino delgado de frangos alimentados com dietas contendo probiótico com cepas mistas (*Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum*) e não evidenciaram diferenças entre o grupo controle e os tratados, concluindo que em condições de baixo desafio sanitário o probiótico não interfere nas características histomorfométricas intestinais. De maneira similar, Pelicano et al. (2003) avaliaram um blend de probióticos (*Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*) sobre as características morfológicas intestinais e não identificaram benefícios no produto.

Quanto a capacidade de interferir na imunidade de frangos o resultados foram mais promissores. Um estudo avaliando o título de anticorpos para doença de Newcastle, o percentual de linfócitos T, características de órgãos linfoides e bactérias do trato intestinal em frangos suplementados com *Lactobacillus* spp., *Bacillus cereus* e polissacarídeos de *Astragalus*, demonstrou uma melhora importante nos parâmetros avaliados e uma redução na contagem de *Escherichia coli* nas fezes dos lotes tratados (LI, ZHAO e WANG, 2009).

Ainda com este objetivo Lourenço et al. (2013) avaliou um probiótico com cepas mistas (*Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum*) em aves inoculadas com *Salmonella* Minnesota aos 14 dias de idade sobre a quantificação de células caliciformes e linfócitos T na mucosa do íleo e ceco. Os autores obtiveram resultados positivos quanto aos parâmetros avaliados e ainda constataram que a contagem de *Salmonella* sp. nas fezes foi significativamente reduzida.

Andreatti Filho et al. (2007) utilizando microbiota cecal cultivada em aerobiose em aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, verificaram que havia uma menor colonização pelo patógeno nos grupos tratados, demonstrando o efeito protetor de bactérias da microbiota de aves adultas administradas em pintainhos recém eclodidos.

Leandro et al. (2010) realizaram três experimentos com probióticos. Em um deles avaliando cepas probióticas mistas (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*) em ovos incubados, os grupos tratados apresentaram pior desempenho. No segundo experimento utilizando *Bacillus subtilis* em ração de pintainhos desafiados com *Salmonella* Enteritidis ocorreu redução cecal do microrganismo patogênico a partir da segunda semana de vida das aves. No terceiro experimento o probiótico foi inoculado em ovos embrionados e os pintainhos desafiados com *Salmonella* Enteritidis na eclosão, e verificou-se que o desempenho das aves foi favorecido e a colonização do papo e do ceco de pintainhos pelo patógeno foi reduzida nos grupos tratados.

Utilizando cepas probióticas de *Bacillus* spp. vários pesquisadores também encontraram resultados divergentes em seus experimentos. Domingues et al. (2014) avaliando o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo probiótico usando cepas de *Bacillus subtilis* verificaram que os

parâmetros zootécnicos avaliados (peso vivo, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade) não se mostraram diferentes significativamente entre os grupos tratados e o grupo controle.

Blair et al. (2004) demonstraram que não houve diferença nos índices zootécnicos entre lotes de perus tratados com probiótico a base de *B. subtilis* ou com o antimicrobiano bacitracina de zinco. No entanto, observaram um efeito benéfico do *B. subtilis* sob a volatilização de amônia da cama. Da mesma forma, pesquisando sobre o desempenho de carcaça de frangos, em trabalho conduzido por Traldi et al. (2009) esse benefício foi relevante após a terceira cama com probiótico a base de *B. subtilis* e *B. coagulans*.

Em contrapartida, Gracia et al. (2009) observaram benefício nos parâmetros zootécnicos de frangos suplementados com *B. subtilis*. Corroborando com os efeitos positivos do *B. coagulans* sobre os índices zootécnicos em frangos, Lin et al. (2011) identificaram ainda um efeito benéfico sobre a microbiota, onde observaram o aumento na contagem de *Lactobacillus* spp. e a diminuição na contagem *E. coli* no intestino das aves.

Estudos conduzidos por Leandro et al. (2010) evidenciaram que a adição de *B. subtilis* na ração ainda evitou a colonização de *Salmonella* Enteritidis no papo e no ceco de pintainhos de três dias. Semelhante a esse, Lourenço et al. (2012) verificaram que a suplementação com *B. subtilis* reduziu a contagem de *Salmonella* sp. e ainda afetou positivamente a mobilização de linfócitos T na mucosa do íleo e ceco de pintainhos.

Ahmed et al. (2014) utilizando cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* como probiótico na dieta de frangos concluíram que houve aumento no desempenho, elevação no título de imunoglobulinas séricas, redução na contagem de *Escherichia coli* fecal e também redução na emissão de amônia (NH₃) e sulfeto de hidrogênio (H₂S) a partir das fezes dos grupos tratados. Lei et al. (2015) avaliaram a mesma cepa em dietas de frangos de corte fornecidas a partir de 22 dias de idade, sendo que a dieta inicial (1 a 21 dias) continha 200mg/Kg de bacitracina de zinco. Os resultados deste estudo demonstraram que os grupos que receberam o probiótico apresentaram maior digestibilidade de nutrientes, redução da contagem cecal de *E. coli* e aumento na população de *Lactobacillus* spp. intestinal. Além disso, a altura de

vilosidades e a relação vilo x cripta foram maiores, o que permitiu concluir que a dieta com esse probiótico melhorou a saúde intestinal das aves.

Esses estudos e outros demonstram que os probióticos a base de *Bacillus* spp. tem impacto na saúde e na produtividade das aves por meio do balanceamento da microbiota intestinal e da modulação da imunidade intestinal.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a ação de dois probióticos comerciais, um a base de cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* e outro com uma composição de *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyoi*, administrados via ração e aplicados na cama sob a microbiota, em relação ao desempenho e características intestinais de frangos de corte.

3.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de colonização intestinal e das camas pelos probióticos e sua interferência com a microbiota, fazendo a contagem de *Bacillus* spp. em cama e fezes e a contagem de *Lactobacillus* spp. nas fezes.
- Mensurar morfometria e área de absorção do duodeno com o uso dos probióticos.
- Avaliar o desempenho zootécnico (ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar) com o uso dos probióticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL

O experimento foi realizado no Biotério de aves da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. A execução do experimento foi aprovada pela comissão de ética e uso de animais – CEUA, sob parecer nº 01/2015 – CEUA/ Faculdade Assis Gurgacz FAG, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

4.2. AVES

Foram utilizados 300 pintainhos machos provenientes de um incubatório comercial de frangos de corte, com um dia de idade da linhagem Cobb (Cobb 500 Slow), provenientes de matrizes de 53 semanas. Os animais estavam saudáveis e vacinados para Doença de Marek, Bouda Aviária, Doença de Gumboro e Bronquite Infecciosa. As aves permaneceram saudáveis durante o experimento, não havendo a necessidade de realizar tratamentos durante o período.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições com 15 aves cada, totalizando 300 aves. Os tratamentos com probióticos foram realizados via ração comercial fornecida ad libitum do primeiro dia no alojamento até o momento final do experimento, aos 28 dias ou aplicado diluído em água estéril, em dose única, diretamente na cama, instantes antes do alojamento das aves.

A ração comercial utilizada no experimento era nutricionalmente balanceada para as exigências de frangos de corte na fase inicial de desenvolvimento. Continha entre seus componentes o antimicrobiano Enramicina, da classe ciclodepsipeptideo, utilizado como aditivo melhorador de desempenho zootécnico em aves (PALERMONETO e ALMEIDA, 2002; MAPA, 2015).

Os tratamentos foram descritos como T1 – controle positivo, onde as aves foram tratadas com ração comercial sem adição de nenhum probiótico e alojadas em cama sem adição de nenhum probiótico; T2 – aves tratadas com ração comercial sem adição de probióticos e cama com aplicação de 5g/m² de probiótico a base de *Bacillus subtilis* (4x10⁸ UFC/g) e *Bacillus toyoi* (4x10⁸ UFC/g); T3 – aves tratadas com ração comercial com adição de probióticos a base de *Bacillus subtilis* (4x10⁸ UFC/g) e *Bacillus toyoi* (4x10⁸ UFC/g) na dosagem de 2Kg/ton e cama com aplicação de 5g/m² de probiótico a base de *Bacillus subtilis* (4x10⁸ UFC/g) e *Bacillus toyoi* (4x10⁸ UFC/g); T4 – aves tratadas com ração comercial com adição de probiótico a base de *Bacillus subtilis* (4x10⁸ UFC/g) e *Bacillus toyoi* (4x10⁸ UFC/g) via ração na dosagem de 2Kg/ton alojadas em cama sem probiótico; T5 – controle comercial, onde as aves foram tratadas com ração comercial acrescida de probiótico a base de *Bacillus amyloliquefaciens* (1x10⁹ UFC/g) na dosagem de 1Kg/ton alojadas em cama sem probiótico.

As cepas utilizadas como probióticos foram adquiridas para mistura em rações e foram homogeneizadas com o auxílio de um misturador manual de 50Kg. A semeadura da cama foi preparada a partir da diluição de 4g do probiótico em 300mL de água estéril e pulverizado sobre a maravalha dentro das gaiolas. Os produtos comerciais foram previamente testados no Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da UFPR - Setor Palotina para conferir a qualidade do inóculo e a ausência de possíveis agentes infecciosos.

4.4. AMBIENTE

As aves foram alojadas em uma sala única de 30m² em baterias de gaiolas experimentais. Cada bateria era composta por quatro gaiolas sobrepostas, sendo que cada gaiola media 100x80 cm (Figura 1). Para mimetizar a situação de campo as gaiolas foram forradas com papel tipo Kraft e 15 cm de maravalha enfardada de

Pinnus eliottii. Durante todo o experimento foram seguidas as recomendações do manual de manejo da linhagem, sendo que o ambiente de alojamento foi pré-aquecido por duas horas para que a temperatura atingisse a zona de conforto.

Figura 1. Baterias de gaiolas utilizadas durante o experimento, sendo que cada bateria possuía quatro gaiolas individuais todas forradas com 15cm de maravalha.



A manutenção do conforto térmico das aves durante os dias do experimento foi seguida conforme a recomendação do manual da linhagem. O suprimento de calor necessário era fornecido, utilizando-se lâmpadas incandescentes, aquecedores elétricos e aparelhos de ar condicionado quando necessário. A ventilação e a renovação do ar ocorria por meio de dois exaustores posicionados na parede lateral da sala.

O fornecimento de água clorada (Figura 2) foi realizado com o auxílio de bebedouros manuais (um por gaiola) e tipo *nipple* (6 por gaiola), sem interrupção em todos os tratamentos, sendo a limpeza realizada diariamente, três vezes ao dia a fim de manter a temperatura e a qualidade adequada da água administrada aos animais. Foi utilizado um comedouro manual por gaiola, que era higienizado diariamente.

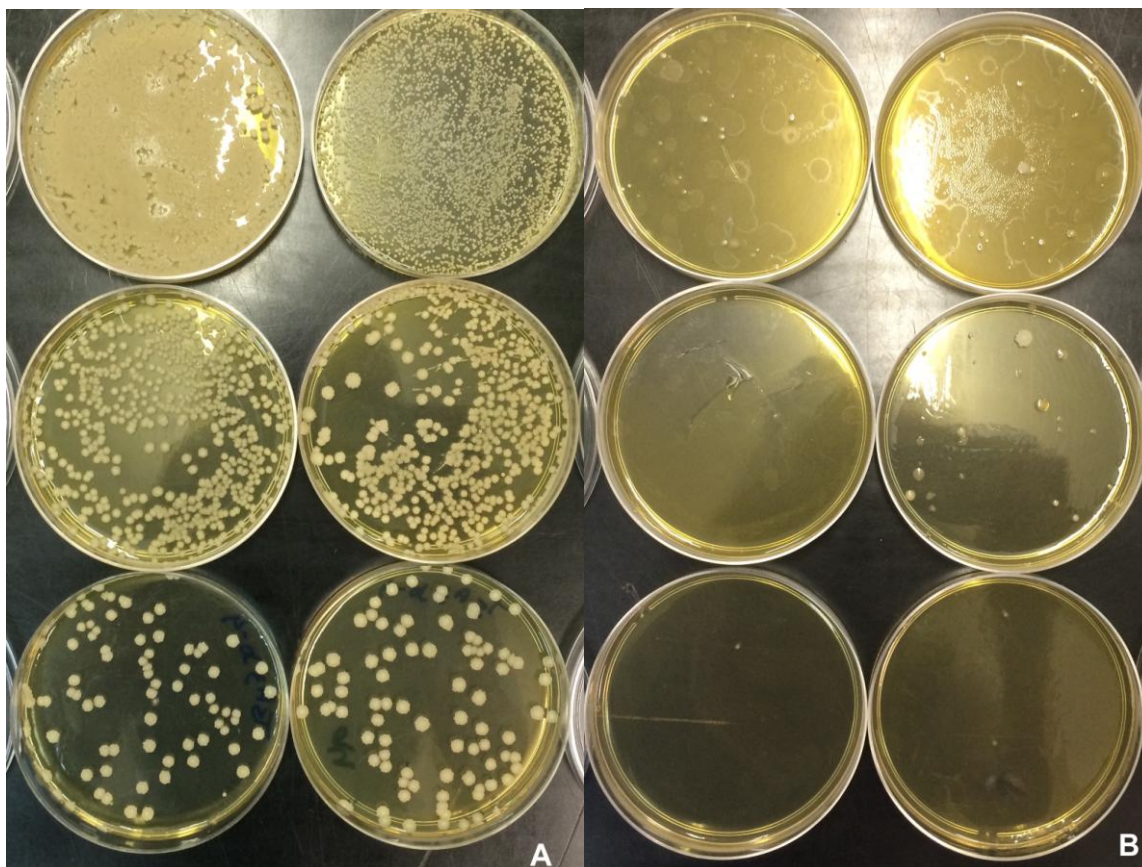
Figura 2. Fornecimento de água. Notar a presença de dois bebedouros tipo nipple e um bebedouro manual.



4.5 CONTAGEM DE *Bacillus* spp. EM INTESTINO

Aos sete, 14, 21 e 28 dias de alojamento oito aves por tratamento (duas por repetição) foram eutanasiadas, por desarticulação cervical. Os intestinos foram coletados de forma asséptica sendo acondicionados individualmente em sacos plásticos estéreis (Nasco Whirl-Pak[®]). No laboratório o intestino foi aberto longitudinalmente e foram coletas as fezes, preferencialmente nas porções finais do órgão. Então, homogeneizava-se e retirava-se uma alíquota de 10g. Essa alíquota era homogeneizada com 90 mL de água estéril e agitada com agitador magnético por três minutos e incubadas em banho-maria a 65°C por 35 minutos (SOUZA, 2011). Após esse período 1 mL dessa solução foi transferida para tubos com 9 mL de água peptonada a 1% e desta realizava-se a diluição seriada até 10^{-4} . As amostras seriadas foram plaqueadas em duplicata, 0,1 mL da solução de cada tubo em placas de meio TSA (caldo de soja triptona a 2% de ágar) que foram uniformemente distribuídas sobre o ágar com a utilização de alças de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24 horas para posterior contagem das colônias. As colônias foram contadas nas placas onde o crescimento se apresentou mais uniforme e identificadas por sua morfologia e análise por método de Gram (Figura 3).

Figura 3. Placas de cultivo com meio TSA. Figura A: Presença de colônias de *Bacillus* spp. em diluições seriadas de amostra de fezes do grupo Controle comercial. Figura B: Ausência de colônias de *Bacillus* spp. em série de diluições de amostra de fezes do grupo Controle positivo.



4.6 CONTAGEM DE *Bacillus* spp. NA CAMA

Aos sete, 14, 21 e 28 dias de alojamento foram coletadas alíquotas individuais da maravalha das gaiolas em cinco pontos equidistantes em cada gaiola e acondicionadas em sacos plásticos estéreis (Nasco Whirl-Pak[®]). No laboratório o material dos cinco pontos coletados foi homogeneizado entre si e retirou-se uma alíquota de 10g que foi processada com metodologia semelhante a descrita para o intestino.

4.7 CONTAGEM DE *Lactobacillus* spp. NO INTESTINO

As mesmas amostras intestinais coletadas para contagem de *Bacillus* spp., nas mesmas idades foram utilizadas para a contagem de *Lactobacillus* spp. No laboratório o material foi homogeneizado e uma alíquota de 10g foi retirada. Essa amostra foi homogeneizada com 90 mL de água estéril e agitada com agitador magnético por três minutos. Após, 1 mL dessa solução foi transferida para tubos com 9 mL de água peptonada a 1% e desta realizava-se a diluição seriada até 10^{-4} . As diluições seriadas foram plaqueadas em duplicata, 0,1 mL da solução de cada tubo em placas de meio MRS (Man, Rogosa & Sharp) que foram uniformemente distribuídas sobre o ágar com a utilização de alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24 horas para posterior contagem das colônias. As colônias foram contadas nas placas onde o crescimento se apresentou mais uniforme e identificadas por sua morfologia, análise por método de Gram e produção de catalase, conforme Konemann et al. (2001).

4.8 MORFOMETRIA INTESTINAL E ÁREA DE ABSORÇÃO DA MUCOSA DO DUODENO

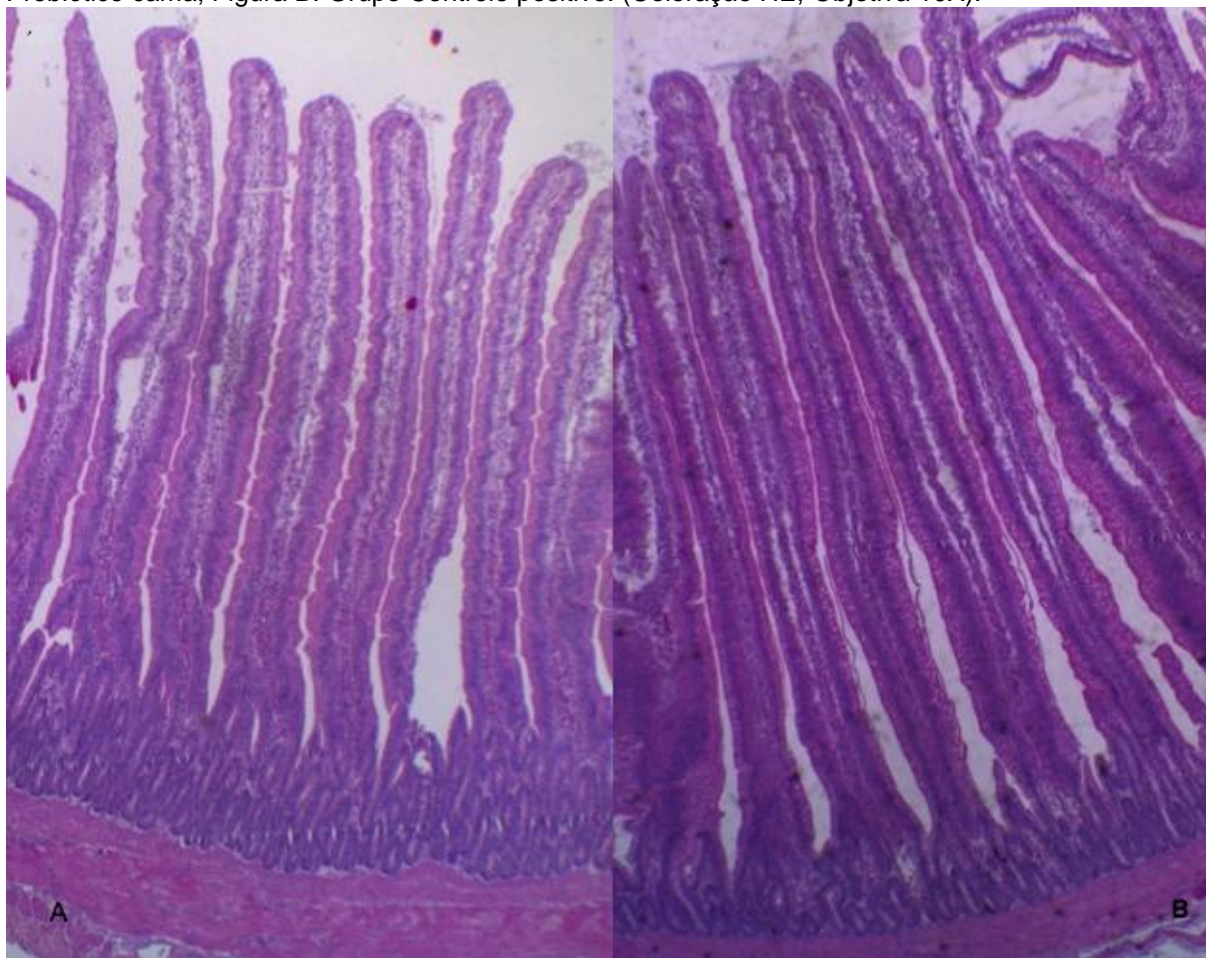
Aos 14 e 28 dias foram coletadas amostras de duodeno de oito aves por tratamento (duas por repetição) para avaliação da morfometria das criptas e vilosidades. As amostras individuais de aproximadamente cinco centímetros de comprimento abertas pela borda mesentérica, distendidas pela túnica serosa e presa longitudinalmente em placas de isopor foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 18 horas. Posteriormente, foram recortadas e lavadas em álcool etílico 70%, e desidratadas em série crescente de álcool etílico. Após desidratação, foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Em cada lâmina histológica foram colocados cinco cortes semi-seriados com 5µm de espessura, sendo que entre estes foram desprezados seis cortes (JUNQUEIRA et al., 2002). Os cortes foram corados segundo a técnica da hematoxilina e eosina (HE). Para o estudo morfométrico as imagens foram capturadas por meio de microscopia de luz (Olympus BX 50) em objetiva de 10x, utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (Image Pro Plus, versão 5.2 – média cibernética). Nesse estudo

foram mensurados o comprimento e largura de 20 vilosidades, assim como a profundidade e largura de 20 criptas de cada ave para o segmento do duodeno coletado (Figura 4). Essas medidas morfométricas foram utilizadas para calcular a superfície de absorção da mucosa intestinal, através da seguinte fórmula (Kisielinski et al., 2002):

$$\text{Área de absorção} = \frac{(LV \times AV) + \left(\frac{LV}{2} + \frac{LC}{2}\right)^2 - \left(\frac{LV}{2}\right)^2}{\left(\frac{LV}{2} + \frac{LC}{2}\right)^2}$$

Onde: LV: largura do vilo, AV: altura do vilo, LC: largura da cripta

Figura 4. Corte histológico de duodeno de frangos de corte aos 14 dias de idade. Figura A: Grupo Probiótico cama; Figura B: Grupo Controle positivo. (Coloração HE, Objetiva 10X).



4.9 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS

Semanalmente as aves e as sobras de ração de todas as repetições de todos os tratamentos foram devidamente pesadas para o cálculo de ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das contagens bacterianas transformadas em \log_{10} , assim como os demais dados, foram submetidos as análises estatísticas através do procedimento GLM do programa estatístico SAS (1992). As médias foram

comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para avaliar a relação entre as contagens de colônias de *Bacillus* spp. e *Lactobacillus* spp. foi utilizada a Correlação de *Pearson* e a análise de regressão para avaliação das coletas para contagem bacteriana.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CONTAGEM BACTERIANA

As contagens de colônias de *Bacillus* spp. nas amostras de fezes, cama e contagem de *Lactobacillus* spp. em fezes realizados aos sete, 14, 21 e 28 dias de experimento estão demonstrados na Tabela 01, representados em Log₁₀/g.

A contagem de *Bacillus* spp. nas fezes avaliou a capacidade das bactérias probióticas sobreviverem e resistirem as condições do trato gastrointestinal das aves e os resultados durante o período de experimento mostram que houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamento e os tempos de coleta.

Tabela 1. Contagens de *Bacillus* spp. em fezes e cama de frangos de corte e *Lactobacillus* spp. em fezes, em função do tratamento e do tempo (Log₁₀/g).

	<i>Bacillus</i> spp. / Fezes	<i>Bacillus</i> spp. / Cama	<i>Lactobacillus</i> spp.
	Tratamentos		
Controle positivo	0,02	0,00 ^b	63,94
Probiótico cama	2,05	1,03 ^b	97,46
Probiótico ração + Cama	20,02	3,87 ^b	150,36
Probiótico ração	14,08	13,54 ^b	103,45
Controle comercial	84,84	116,87 ^a	134,99
	Tempos		
07 dias	14,20	19,11	18,84
14 dias	9,35	44,79	143,33
21 dias	29,24	20,63	142,60
28 dias	44,03	23,75	135,40
Análise de Variância			
Tratamento	0,0096	0,0013	0,8525
Tempo	0,0004	0,7919	<0,0001
Tratamento x Tempo	<0,0001	0,9763	0,1165
CV, %	122,26	142,73	59,64

*Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

No desdobramento da interação (Tabela 02) pode ser observado que na coleta realizada aos sete dias não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$)

entre os tratamentos, embora as cepas probióticas fossem recuperadas das fezes em todos os grupos que receberam probióticos na ração, o que demonstra sua capacidade de sobrevivência no ambiente gastrointestinal das aves. O grupo Probiótico cama, que foi alojado em maravalha inoculada com cepa probiótica, não apresentou contagem do microrganismo nas fezes aos sete dias, demonstrando que não houve relação entre o inóculo na cama e a colonização intestinal das aves nessa primeira semana. Como esperado, não houve recuperação de *Bacillus* spp. nas fezes dos animais do grupo Controle positivo, uma vez que não receberam probiótico por nenhuma via.

Tabela 2 . Média das contagens de *Bacillus* spp. nos dias sete, 14, 21 e 28, isolada de fezes de frangos submetidos a diferentes tratamentos com probióticos (Log₁₀/g).

	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias	Regressão
Controle positivo	0,00 ^a	0,06 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	NS
Probiótico cama	0,00 ^a	7,58 ^{bc}	0,62 ^b	0,00 ^b	NS
Probiótico ração + cama	27,50 ^a	25,00 ^a	8,83 ^b	18,77 ^b	NS
Probiótico ração	25,00 ^a	0,98 ^c	1,50 ^b	28,85 ^b	NS
Controle comercial	18,50 ^a	13,12 ^{ab}	135,25 ^a	172,50 ^a	Linear ¹
Valor de P	0,6015	<0,0001	0,0002	<0,0001	

*Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (p>0,05) NS: Não significativo; ¹y=611875+83446x; R²= 0,6238i

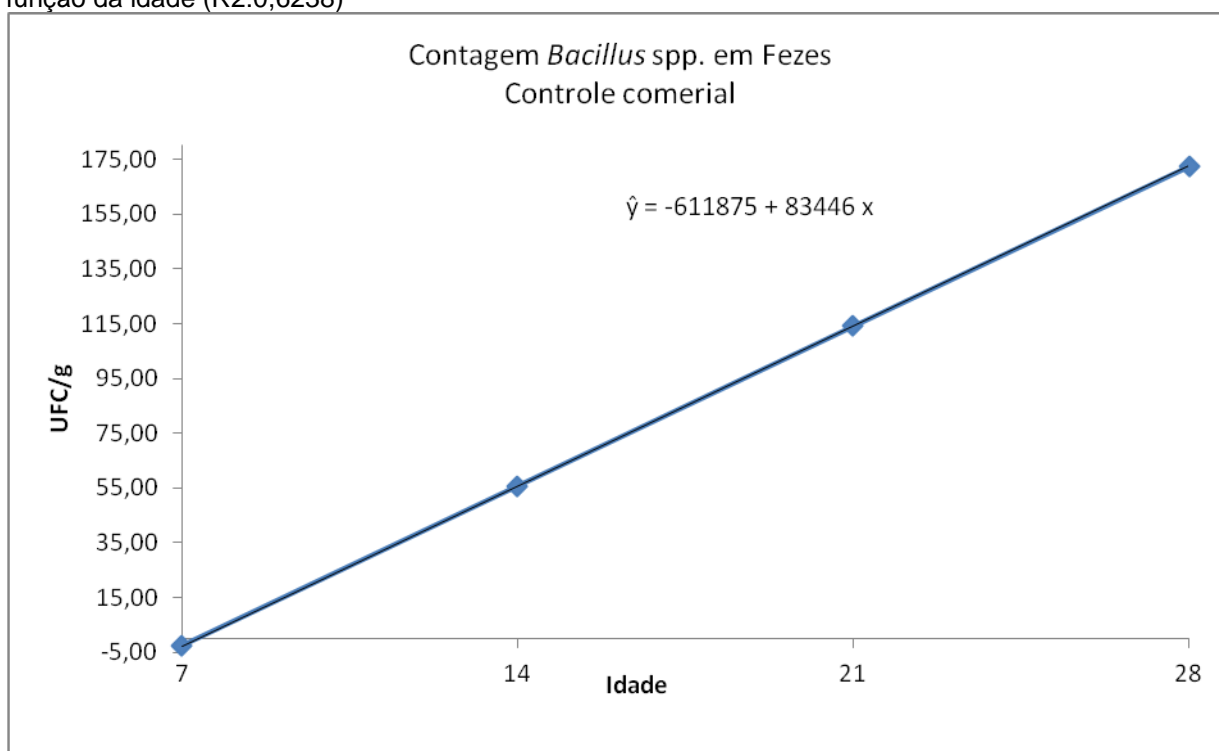
Aos 14 dias, entretanto, houve diferença significativa (p< 0,05) na contagem dos microrganismos. O grupo Probiótico ração + cama resultou na maior contagem, entretanto não diferiu do controle comercial, que obteve contagens intermediárias, juntamente com grupo Probiótico Cama. Os menores valores foram atribuídos aos tratamento controle positivo e probiótico ração.

O desenvolvimento da microbiota nos primeiros dias pós eclosão obedece um padrão exponencial e o equilíbrio desse ecossistema varia com o tempo e o segmento intestinal, sendo que o intestino delgado das aves tem sua microbiota equilibrada somente a partir de duas semanas pós eclosão. O crescimento exponencial inicial é logo seguido por uma fase de atraso causado pela depleção de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos (APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006).

Portanto, a fase de transição e imaturidade desse ecossistema nesse momento pode justificar a variação encontrada nos diferentes grupos aos 14 dias.

Aos 21 e 28 dias, as contagens de *Bacillus* spp. em fezes foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no grupo Controle comercial, em relação aos demais grupos. Dentre todos os tratamentos avaliados, apenas o grupo Controle Comercial apresentou contagens crescentes ao longo do tempo, com acréscimo linear contínuo quando comparado aos demais tratamentos (Figura 5).

Figura 5 – Contagem de *Bacillus* spp. em fezes de frangos de corte do grupo Controle comercial em função da idade ($R^2:0,6238$)



Com a microbiota estabilizada e evoluindo para a maturidade (LEE et al., 2010), a presença da cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* do grupo Controle comercial e em quantidade crescente nas amostras demonstra sua capacidade de resistir, sobreviver e ser metabolicamente ativo nas condições gastroentéricas (GUARNER et al., 2008).

Isso pode ter ocorrido por alguma característica dessa espécie bacteriana, como a produção de enzimas extracelulares, entre elas, α -amilase, celulase,

metaloproteases, proteases (AHMED et al., 2014), α -acetolactato, descarboxilase, endoglucanase, hemicelulases, fitase, amilase maltogênica e xilanases (SUPRIYATI et al., 2015). A capacidade do *B. amyloliquefaciens* produzir bacteriocinas, como a barnase (ULYANOVA et al. 2011, citado por AHMED et al. 2014), subtilina e mersacidina (HERZNER et al. 2011), que inibem o crescimento de outras bactérias competidoras pode ter permitido sua permanência no ambiente intestinal. Ahmed et al. (2014) avaliaram cepas da mesma espécie sob as características da microbiota cecal de frangos de corte e, diferentemente dos resultados obtidos nesse estudo, não encontraram interferência na contagem de *Bacillus* spp. intestinal.

Nesse trabalho o uso de probióticos com cepas de *Bacillus subtilis* e *B. toyoi* não apresentou contagens intestinais superiores, no entanto, a capacidade de germinação dos esporos de *B. subtilis* no trato intestinal e sua atividade probiótica foi caracterizada por Casula e Cutting (2002) em um modelo murino. Os resultados dos estudos de Appelt et al. (2010), Traldi et al. (2009), Gracia et al. (2009) e Leandro et al. (2010) demonstraram efeito benéfico dessa cepa probiótica em frangos, porém, em outras condições experimentais.

A eficácia de uma cepa probiótica é dependente de inúmeros fatores, como a dose administrada, método e frequência de aplicação, idade da aplicação, fatores de estresse ambiental entre outros (GUARNER et al., 2008). A administração desse tipo de aditivo pode influenciar em outros aspectos que não foram avaliados nesse estudo, dentre eles, sua capacidade de interferir no sistema imune e resposta a desafios sanitários (LEE et al., 2010). Portanto, esse estudo não descarta a hipótese de que essas mesmas cepas probióticas possam conferir benefícios em outras condições experimentais.

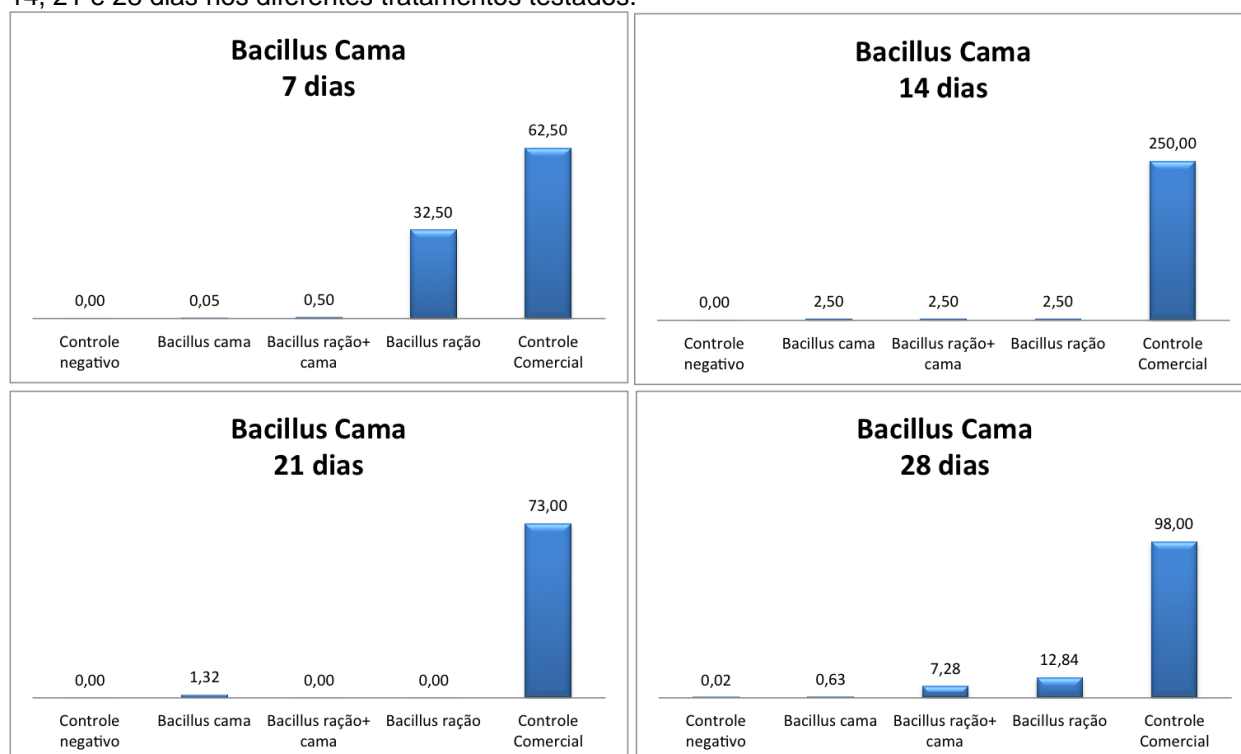
Em nenhuma idade avaliada (sete, 14, 21 e 28 dias) as contagens de *Bacillus* spp. nas fezes do grupo Probiótico cama foram significativamente superiores ao grupo Controle positivo, embora o microrganismo estivesse presente nas fezes dessas aves aos 14 e 21 dias. Ainda que o produto avaliado não contivesse a indicação para aplicação na cama, havia a expectativa que a capacidade de esporulação do *Bacillus* spp. associada ao comportamento e condições de criação das aves com estreito contato a cama facilitassem essa conexão. A formação da microbiota em aves é dependente de seu contato com o ambiente e dos

microrganismos presentes nele (LEE et al., 2010; JURICOVA et al., 2012). A presença de uma cepa bacteriana com efeito benéfico em um dos primeiros ambientes de contato das aves, a cama, poderia direcionar a formação da microbiota endógena, fato que não foi demonstrado nesse estudo.

No entanto, a garantia da eficácia do probiótico é dependente de fatores como dosagem e tipo de veículo utilizado (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010; GUARNER et al., 2008). Uma vez que não havia indicação em bula para a aplicação na cama, a dose utilizada na aplicação da maravalha nesse estudo foi realizada através de uma extrapolação empírica (5g/m^2), no entanto, equivalente a outras avaliações de probióticos similares na cama de aves (ROLL et al., 2008). É provável que a dose utilizada neste caso não fosse suficiente para causar o efeito probiótico da bactéria, como sobreviver, colonizar e ser metabolicamente ativo no sítio alvo (GUARNER et al., 2008) aos sete dias, uma vez que a ingestão da bactéria não era dependente da ingestão da ração e sim do contato da ave com o ambiente e a cama. A possibilidade da cama atuar como um veículo que não garantisse a estabilidade da cepa probiótica fica anulada pois aos 14 e 21 dias de idade a cepa pode ser recuperada das fezes das aves. Aos 28 dias esse evento não ocorreu e a cepa não foi mais recuperada nas fezes, provavelmente devido ao processo de maturação da microbiota intestinal das aves e a não permanência da cepa probiótica nesse ecossistema (APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006).

Quanto a contagem de *Bacillus* spp. na cama, não foi observada interação significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos e os tempos de coleta. Entretanto, houve diferença significativa ($p<0,05$) no crescimento de *Bacillus* spp. nas camas em relação aos tratamentos, sendo que o Controle comercial apresentou maiores contagem semanais ($p<0,05$), independente do tempo de tratamento (Tabela 01). As contagens de *Bacillus* spp. estão graficamente demonstradas na Figura 6 e pode-se observar que o Grupo controle comercial sempre se mostrou superior aos demais.

Figura 6 - Contagens de colônias de *Bacillus* spp. em Log10/g em cama de frangos de corte aos sete, 14, 21 e 28 dias nos diferentes tratamentos testados.



A composição físico-química da cama de aviário proporciona um ótimo meio para a multiplicação bacteriana, sobretudo as originárias das excretas das aves. Suas fezes introduzem concentrações consideráveis de espécies microbianas compondo dessa maneira uma microbiota específica que apresenta a mesma concentração bacteriana intestinal endógena das aves. Microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp., *E. coli* e *Campylobacter* spp. podem estar presentes, no entanto, cepas benéficas como *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. e outros Gram positivos presentes na microbiota endógena da ave podem compor a heterogeneidade desse composto (WADUD et al., 2012; FIORENTIN, 2005).

Segundo Casula e Cutting (2002), esporos de *Bacillus* spp. utilizados como probióticos germinam no intestino, colonizam, se multiplicam e são eliminados no conteúdo fecal, sendo então o hospedeiro atuante como agente multiplicador do microrganismo, que por ser esporulado, teria maior condições de sobrevivência no ambiente. Wadud et al. (2012) demonstraram que a cama pode conter esse microrganismo em sua microbiota. No entanto, os resultados desse estudo apontam que a utilização desses microrganismos probióticos administrados na ração, ou ainda que diretamente aplicados sobre a cama das aves, não garantem a

interferência na microbiota da cama e o retorno de sua contagem, efeito que pode sofrer interferência do tipo de produto inoculado (cepa ou veículo).

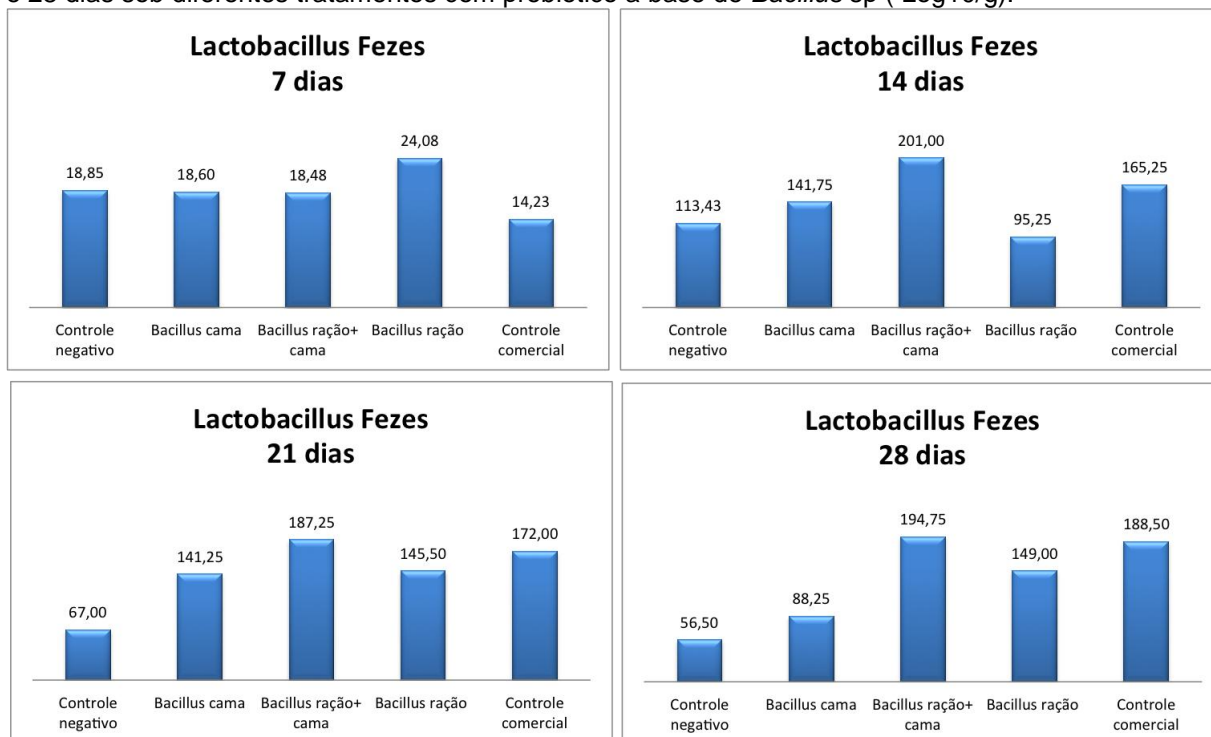
Ainda que nenhum dos produtos utilizados no experimento tivesse essa indicação de bula, a administração do probiótico utilizado no grupo Controle comercial na ração se mostrou mais efetiva para a colonização ambiental. Isso pode ser justificado pela produção de enzimas extracelulares ou bacteriocinas pela cepa que garantiram sua sobrevivência no ambiente, ou ainda, ao veículo utilizado, que pode ter influenciado em sua capacidade de resistência na cama (AHMED et al., 2014; SUPRIYATI et al., 2015).

Já o produto probiótico que apresentava as cepas de *B. subtilis* e *B. toyoi* não foi recuperado da cama em quantidades maiores que o grupo Controle positivo. A possibilidade da interação de outros microrganismos presentes no substrato e a competição com outros microrganismos presentes na microbiota da cama, em um modelo de exclusão competitiva, podem justificar esse apontamento (FIORENTIN, 2005; GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010). Além desses efeitos há a possibilidade da constituição e características da cama atuarem como um veículo de suspensão para as cepas probióticas de maneira que diminuíssem sua viabilidade (GUARNER et al., 2008).

Deve-se ainda considerar o fato de se tratar de cama nova, sem nenhuma reutilização e portanto, com contagem bacteriana reduzida. Sabendo-se que ocorre um acréscimo na concentração de microrganismos por cada reutilização (FIORENTIN, 2005) associado ao fato das cepas de *Bacillus* spp. esporularem e serem mais viáveis e resistentes no ambiente, persistindo o consumo do probiótico, existe a possibilidade de haver também um acréscimo na contagem dessa cepa ao longo da sequência de reutilização das camas, prática comum na produção de frangos de corte.

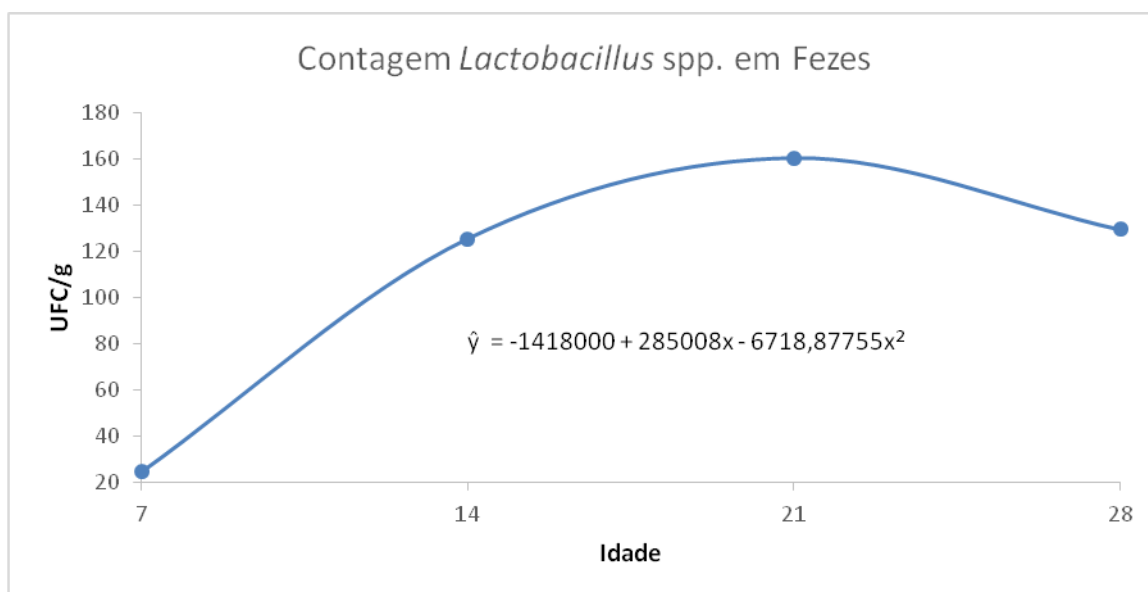
A análise das médias de isolamento de *Lactobacillus* spp. nas fezes das aves avaliou a capacidade do probiótico alterar características de sua microbiota endógena. Não houve interação significativa entre tratamentos e tempo no isolamento de *Lactobacillus* spp. nas fezes das aves (Tabela 1). Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre a contagem de *Lactobacillus* spp. (Figura 7) entretanto, houve efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de coleta (Figura 8).

Figura 7 - Contagens de colônias de *Lactobacillus* spp. em fezes de frangos de corte aos sete, 14, 21 e 28 dias sob diferentes tratamentos com probiótico a base de *Bacillus* sp (Log10/g).



De acordo com a Figura 8, independente do tipo de tratamento, as contagens apresentaram um comportamento quadrático com aumento até o dia 21, onde iniciou um declínio até o dia 28, final do experimento.

Figura 8 – Contagem de *Lactobacillus* spp. em fezes de frangos de corte (R²=0,3936).



Todos os grupos experimentais adotaram um comportamento condizente com o efeito de maturação da microbiota, onde ocorre um aumento expressivo na fase inicial de colonização (primeira semana de vida), seguida por uma fase de redução na taxa de crescimento de microrganismos, até um momento de estabilização da população microbiana e maturidade do ecossistema (APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006).

A composição da microbiota de aves é variada e ainda pouco conhecida, um vez que a maioria dos microrganismos descobertos por sequenciamento de rDNA ainda não foram identificados. No entanto, entre os microrganismos conhecidos, a maior predominância no intestino delgado é de espécies de *Lactobacillus* (LEE et al., 2010; APAJALAHTI e KETTUNEN, 2006) de maneira que esse gênero pode ser utilizado como um marcador para o desenvolvimento da microbiota das aves. *Lactobacillus* spp. são microrganismos Gram positivos produtores de ácido láctico que apresentam funções benéficas para o equilíbrio intestinal e saúde do hospedeiro (ANDREATTI FILHO et al., 2006; NOURI et al., 2010; MENCONI et al., 2011).

Estudos como o de Lin et al. (2011), LI, ZHAO e WANG (2009), An et al. (2008) e Lei et al. (2015) evidenciaram um aumento significativo na contagem de *Lactobacillus* spp. no intestino de aves tratadas com *Bacillus* spp. como probiótico, efeito divergente do encontrado nesse estudo, que não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e o Controle positivo. Já no estudo de Sen et al.

(2012), não foi observado aumento na contagem de bactérias ácido lácticas em aves suplementadas com *Bacillus subtilis*.

Foi também verificada a associação entre o isolamento de *Lactobacillus* spp. nas fezes, *Bacillus* spp. nas fezes e *Bacillus* spp. na cama. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos por meio da análise de correlação.

Tabela 3. Coeficientes de correlação de *Pearson* para contagem de *Bacillus* spp. nas fezes, contagem de *Bacillus* spp. na cama e contagem de *Lactobacillus* spp. nas fezes (Log_{10}/g).

	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp. Fezes	<i>Bacillus</i> spp. Cama
<i>Lactobacillus</i> spp.	1,00	0,294 ¹	0,175 ²
<i>Bacillus</i> spp. Fezes		1,00	0,338 ³
<i>Bacillus</i> spp. Cama			1,00

*Valores de P - ¹: 0,0081; ²: 0,1206; ³: 0,0022

Os valores da correlação de *Pearson* mostraram uma correlação positiva ($r=0,294$) significativa entre a contagem de *Bacillus* spp. e a contagem de *Lactobacillus* spp. nas fezes e correlação positiva ($r=0,338$) entre a contagem de *Bacillus* spp. nas fezes e na cama. Não foi observada correlação estaticamente significativa entre o isolamento de *Bacillus* spp. na cama e o isolamento de *Lactobacillus* spp. nas fezes. Os coeficientes de correlação, embora significativos, foram baixos. É importante salientar, no entanto, que a presença de probióticos é apenas um dos fatores que interferem na formação e composição da microbiota, que também é influenciada por outros, como as características dos microrganismos que já existiam no ambiente intestinal antes da introdução da cepa probiótica, o tipo de dieta fornecida, a idade das aves e ainda as próprias condições do ambiente de alojamento, com maior ou menor desafio estressor (GUARNER et al., 2008).

5.2. MORFOMETRIA INTESTINAL

A análise das características morfológicas intestinais, como altura de vilo, profundidade de cripta, relação vilo:cripta e área de absorção da mucosa intestinal mostra a capacidade do probiótico interferir nas característica histológicas do intestino das aves e consequentemente, em sua função. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos aos 14 dias de idade. Entretanto, aos 28

dias, as menores profundidades de criptas foram obtidas nos grupos Controle positivo e Controle comercial e profundidades intermediárias foram registradas aos grupos Probiótico ração + cama e Probiótico ração. As criptas mais profundas foram registradas no grupo Probiótico cama (Tabela 04).

Tabela 4. Comprimento de vilo, profundidade de cripta, relação vilo:cripta (V:C) e área de absorção (AA) da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 14 e 28 dias de idade

	Vilo, μm	Cripta, μm	V:C	AA, μm^2
14 dias				
Controle positivo	1589,50 ^a	259,00 ^a	6,25 ^a	27,66 ^a
Probiótico cama	1661,00 ^a	280,50 ^a	6,16 ^a	27,38 ^a
Probiótico ração + cama	1668,25 ^a	253,00 ^a	6,69 ^a	27,93 ^a
Probiótico ração	1687,50 ^a	251,25 ^a	6,80 ^a	28,90 ^a
Controle comercial	1703,33 ^a	245,00 ^a	7,07 ^a	30,29 ^a
CV, %	5,73	9,93	10,13	6,54
Valor de P	0,1597	0,5846	0,1539	0,0924
28 dias				
Controle positivo	2059,00 ^a	302,75 ^b	7,00 ^a	29,53 ^a
Probiótico cama	2099,00 ^a	372,25 ^a	5,90 ^a	28,74 ^a
Probiótico ração + Cama	2244,00 ^a	367,50 ^{ab}	6,51 ^a	29,95 ^a
Probiótico ração	2156,25 ^a	332,50 ^{ab}	6,69 ^a	29,12 ^a
Controle comercial	2119,00 ^a	286,00 ^b	7,58 ^a	31,29 ^a
CV, %	7,90	10,23	11,86	6,10
Valor de P	0,6226	0,0038	0,0729	0,6057

*Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($p>0,05$).

As criptas intestinais, invaginações tubulares que iniciam na base do vilo, tem a função de realizar a proliferação de células do epitélio intestinal e manter o *turnover* celular que promove a reposição das perdas celulares na região apical da vilosidade no processo natural de extrusão (GAVA, 2012). O equilíbrio na relação entre proliferação e extrusão determinam a profundidade da cripta e altura do vilo intestinal. Quanto maior for a necessidade de proliferação, maior a profundidade da cripta e quanto maior a extrusão, menor a altura do vilo (GAVA, 2012; JEURISSEN et al., 2012; VIOLA e VIEIRA, 2007). Criptas com menor profundidade estão associadas a um melhor estado de saúde intestinal (VIOLA e VIEIRA, 2007) e menor gasto energético para manutenção das condições fisiológicas da mucosa intestinal (MAIORKA, 2004).

As profundidade menores das criptas do grupo Controle comercial e grupo Controle positivo indicam menor demanda por novas células a partir da cripta e podem refletir um melhor estado de saúde intestinal. Embora os valores de profundidade da cripta destes tratamento não terem sido suficientes para alterar significativamente os cálculos de relação vilo:cripta e área de absorção intestinal, acredita-se que esse evento garantiria uma melhor qualidade de resposta da ave frente a um desafio sanitário intestinal. É possível que nesse aspecto a utilização do antimicrobiano aditivo melhorador de desempenho (Enramicina) tenha surtido efeito benéfico no grupo controle positivo e atuado em sinergismo com o probiótico do controle comercial, o que pode justificar as menores profundidades das criptas destes grupos.

Em avaliações similares, Pelicano et al. (2003) não evidenciaram alterações na altura de vilos e profundidade de criptas de aves suplementadas com cepas de *Bacillus* spp. Já os estudos de Sen et al. (2012), demonstraram um aumento linear na altura de vilosidade e relação vilo x cripta com a utilização de doses crescentes de *Bacillus subtilis* como probiótico. Lei et al. (2015) utilizando a cepa probiótica de *Bacillus amyloliquefaciens* encontraram resultados positivos no acréscimo de altura de vilo e relação vilo:cripta quando comparados ao grupo controle.

5.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Não houve diferença significativa no desempenho zootécnico entre os tratamentos nas idades avaliadas (Tabela 5). Esses resultados corroboram as análises anteriores que não mostraram diferenças entre os grupos Controle positivo, Probiótico cama, Probiótico ração + cama e Probiótico ração. O grupo Controle comercial, embora tenha demonstrado resultados positivos em algumas avaliações, não foi influenciado por essas alterações de maneira a melhorar seus índices de desempenho.

Estudos prévios avaliando a associação da Enramicina com cepas de *Bacillus subtilis* não observaram interação que resultasse em antagonismo ou sinergismo entre os produtos (ZHANG, CHO e KIM., 2013). Não foram encontrados estudos

similares associando a cepa *Bacillus amyloliquefaciens* como cepa probiótica e Enramicina como aditivo melhorador de desempenho zootécnico.

Tabela 5. Desempenho produtivo semanal de frangos de corte suplementados com probiótico na ração ou na cama no período de um a 28 dias de idade

	Ganho de peso, g	Consumo de ração, g	Conversão alimentar
	1 a 7 dias		
Controle positivo	162,87 ^a	190,13 ^a	1,168 ^a
Probiótico cama	158,70 ^a	194,80 ^a	1,229 ^a
Probiótico ração + cama	157,33 ^a	202,57 ^a	1,290 ^a
Probiótico ração	162,77 ^a	190,70 ^a	1,173 ^a
Controle comercial	157,20 ^a	180,10 ^a	1,147 ^a
CV, %	3,37	6,59	8,07
Valor de P	0,3878	0,2105	0,2710
	1 a 14 dias		
Controle positivo	457,97 ^a	539,65 ^a	1,179 ^a
Probiótico cama	465,00 ^a	529,22 ^a	1,139 ^a
Probiótico ração + Cama	457,83 ^a	534,31 ^a	1,169 ^a
Probiótico ração	472,42 ^a	553,19 ^a	1,172 ^a
Controle comercial	464,05 ^a	555,93 ^a	1,198 ^a
CV, %	4,97	5,05	4,31
Valor de P	0,8913	0,5871	0,5871
	1 a 21 dias		
Controle positivo	961,06 ^a	1199,82 ^a	1,249 ^a
Probiótico cama	979,09 ^a	1224,05 ^a	1,250 ^a
Probiótico ração + Cama	967,20 ^a	1156,48 ^a	1,250 ^a
Probiótico ração	984,11 ^a	1173,73 ^a	1,193 ^a
Controle comercial	1011,17 ^a	1229,93 ^a	1,216 ^a
CV, %	2,74	4,75	4,35
Valor de P	0,1473	0,3362	0,4599
	1 a 28 dias		
Controle positivo	1524,45 ^a	2249,25 ^a	1,477 ^a
Probiótico cama	1542,05 ^a	2206,95 ^a	1,432 ^a
Probiótico ração + Cama	1493,31 ^a	2172,84 ^a	1,458 ^a
Probiótico ração	1562,48 ^a	2230,99 ^a	1,427 ^a
Controle comercial	1605,28 ^a	2218,90 ^a	1,382 ^a
CV, %	4,03	4,21	3,97
Valor de P	0,1793	0,8213	0,2294

*Médias com a mesma letra não diferem significativamente (p>0,05).

Diversos estudos mostram resultados contraditórios para avaliações de parâmetros zootécnicos utilizando probióticos. Diferente dos resultados encontrados nesse estudo, An et al. (2008), que avaliaram o ganho de peso, consumo de ração e

conversão alimentar em frangos de corte suplementados com *Bacillus amyloliquefaciens*, verificaram melhor ganho de peso e uma tendência a melhor conversão alimentar, assim como Ahmed et al. (2014), com a mesma cepa, demonstraram melhor performance de crescimento e melhor eficiência alimentar em frangos de corte criados até os 35 dias. De maneira similar, usando *Bacillus subtilis*, Gracia et al. (2009) avaliando frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade e Sen et al. (2012) averiguaram melhor ganho de peso e conversão alimentar durante seus experimentos conduzidos com frangos de corte e avaliados aos 35 dias de idade. Lei et al. (2015), utilizando duas dosagens de *Bacillus amyloliquefaciens* ($7,5 \times 10^7$ e $1,5 \times 10^8$ UFC/Kg) demonstrou maior ganho de peso e menor conversão alimentar.

De maneira divergente aos resultados anteriores e similar aos resultados encontrados nesse estudo, Lima et al. (2003), não observaram melhor peso médio ou conversão alimentar em frangos de corte recebendo dietas suplementadas com *Bacillus subtilis*, assim como, Domingues et al. (2014) e Traldi et al. (2009) (que associou a cepa *B. coagulans*), que não evidenciaram efeitos positivos no consumo de ração, ganho de peso ou conversão alimentar em frangos de corte utilizando esses probióticos.

Em outros trabalhos utilizando probióticos na cama das aves, de maneira similar aos resultados encontrados nesse estudo, Cruz et al. (2013), constataram que o efeito da adição de microrganismos benéficos na cama de frangos de corte não interferiu no desempenho zootécnico e Otutumi et al. (2013), utilizando uma composição de *Bacillus megaterium*, *Nitrosomonas* e *Bacillus subtilis* diretamente sobre a cama de frangos de corte demonstrou que a conversão alimentar e o ganho de peso de frangos de corte não foram influenciados.

6. CONCLUSÕES

O tratamento com produto probiótico a base de *Bacillus amyloliquefaciens* administrado via ração não demonstrou ser capaz de alterar a composição da microbiota ou as características morfológicas intestinais e tampouco interferir no desempenho zootécnico das aves, assim como, o tratamento com o produto composto de *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyoi*, que também não apresentou diferenças nessas avaliações quando comparado ao grupo Controle positivo.

Não foi observada colonização intestinal pelo produto composto de *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyoi*, em nenhuma via de administração (cama, ração ou cama e ração) uma vez que as contagens não diferiram do grupo controle. Já no grupo Controle comercial (*Bacillus amyloliquefaciens*) ocorreu um acréscimo linear para as contagens ao longo das semanas, demonstrando sua capacidade de colonização intestinal das aves.

A contagem da cepa probiótica na cama não diferiu entre os tratamentos com *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyoi* e o grupo Controle positivo, mas foi maior no grupo Controle comercial comparada a todos os outros tratamentos, efeito que pode ser causado pela maior presença do microrganismo nas fezes, pela própria colonização da cama ou o efeito cumulativo dos dois eventos associados.

As variações nas contagens de *Bacillus* spp. não interferiram na contagem de *Lactobacillus* spp. Houve interferência apenas do tempo sem relação com os tratamentos realizados, com efeito de crescimento quadrático, aumentando até o vigésimo primeiro dia e na sequência, reduzindo até o último dia de experimento. Esse comportamento é condizente com o processo de maturação da microbiota.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. T.; ISLAM, M.; MUN, H. S.; SIM, H. J.; KIM, Y.; YANG, C. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. **Poultry Science**, v.93, p. 1963–1971, 2014.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; OKAMOTO, A. S.; SAMPAIO, H. M. Uso de microbiota cecal congelada com crioprotetores em pintos infectados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 647-653, 2007.
- AN, B. K.; CHO, B. L.; YOU, S. J.; PAIK, H. D.; CHANG, H. I.; KIM, S. W.; YUN, C. W.; KANG, C. W. Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast derived β -Glucan and single strain probiotics. **Asian Australas Journal of Animal Science**, v. 21, n. 7, p. 1027-1032, 2008.
- APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A. Microbes of the chicken gastrointestinal tract. Em: **Avian Gut Function in Health and Diseases**. Ed. G.C Perry. Chapter 8. p. 124-137, 2006.
- APPELT, M. D.; NUNES, R. V.; POZZA, P. C.; SILVA, W. T. M.; VENTURI, I.; NUNES, C. G. V. Níveis de probiótico em rações de origem animal e vegetal para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 765-771, 2010.
- BLAIR, E. C.; ALLEN, H. M.; BROOKS, S. E.; FIRMAN, J. D.; ROBBINS, D. H.; NISHIMURA, K.; ISHIMARU, H. Effects of Calsporin® on turkey performance, carcass yield and nitrogen reduction. **International Journal of Poultry Science**. v. 3 n.1, p 75-79, 2004.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 15** de 26/05/2009. Regulamento o registro dos estabelecimentos e dos produtos destinados à alimentação animal. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao/sislegis>> Acesso em 04 ago 2015.
- CASULA, G.; CUTTING, S. M. Bacillus probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology** v. 68 n. 5 p 2344-2352, 2002.
- CHAMBERS, J. R.; GONG, J. The intestinal microbiota and its modulation for Salmonella control in chickens. **Food Research International** v. 44 p. 3149-3159, 2011.
- CRUZ, D. P.; OTUTUMI, L. K.; PIAU JR., R.; PANUCCI, C.; MEZALIRA, T. S.; GERÔNIMO, E. Performance, carcass yield and litter quality of broilers raised on litter treated with microorganisms. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 41-48, Goiânia, 2013.

DOMINGUES, C. H. F.; SANTOS, E. T.; CASTIBLANCO, D. M. C.; QUADROS, T. C. O.; PETROLI, T. G.; DUARTE, K. F.; JUNQUEIRA, O. M. Avaliação do desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo probiótico nas diferentes fases de criação. **Revista Agrocientífica**, v.1., n.1, p. 7-16, 2014.

DONOGHUE A. M.; FARNELL, M. B.; COLE, K.; DONOGHUE, D. J. Mechanisms of pathogen control in the avian gastrointestinal tract. In: **Avian Gut Function in Health and Diseases**. Ed. G.C Perry. Cap. 9. p. 138-155, 2006.

European Communities (EC), 2003. Commission of the European Communities Commission Regulation (EC) nº 1831/2003. **Official Journal of European Union** L. 268, 29-43. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT-EN/TXT/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN>> Acesso em 04 ago 2015.

ESTRADA, WILKIE E DREW, A.; WILKIE, D. C.; DREW, M. Administration of *Bifidobacterium bifidum* to chicken broilers reduces the number of carcass condemnations for cellulitis at the abattoir. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, n. 4, p. 329-334, 2001.

FAO/WHO. **Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canada; 2002 Apr 30 to May 1. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>>. Acesso 04 ago 2015.

FERREIRA, A. P.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, Chapecó, 2006. **Anais**. P. 56-66.

FIORENTIN, L. **Reutilização da cama na criação de frangos e as implicações de ordem bacteriológica na saúde humana e animal**. Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, 2005.

FURLAN, MACARI E LUQUETTI, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de probióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: 5º SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO. **Anais**. Balneário Camboriú, SC, 2004.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International journal of Food Microbiology** v. 141 p. 515-528. 2010.

GAVA, M.S. **Metodologia de morfometria intestinal em frangos de corte**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, especialidade de Sanidade Avícola) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

GRACIA, M.; ESTEVE-GARCIA, E.; CACHALDORA, P.; MARUBASHI, T.; McCARTENY, E.; MEDEL, P.; VAN DER AR, A. **Efficacité d'un probiotique a base de Bacillus em poulets de chair**. Huitièmes Journées de La Recherche Avicole, St. Malo, 2009.

GUARNER, F.; KHAN, A. G.; GARISCH, J.; ELIAKIM, R.; GANGL, A.; THOMSON, A.; KRABSHUIS, J.; MAIR, T. L.; KAUFMANN, P.; PAULA, J. A.; FEDORAK, R.; SHANAHAN, F.; SANDERS, M. E.; SZAJEWSKA, H. Probiotics and prebiotics. **World Gastroenterology Organization Practice Guideline**, 2008.

GREEN, D. H.; WAKELEY, P. R.; PAGE, A.; BARNES, A.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Applied and Environmental Microbiology** v.65 n.9 p.4288-4291, 1999.

HERZNER, A. M.; DISCHINGER, J.; SZEKAT, C.; JOSTEN, M.; SCHMITZ, S.; YAKELEBA, A.; REINARTZ, R.; JANSEN, A.; SAHL, H. G.; PIEL, J.; BIERHAUM, G. Expression of the Lantibiotic Mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p 1-8, 2011.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.17, n. 2, p. 55-62, 1997.

JEURISSEN, S. H. M.; LEWIS, F.; KLIS, J. D. V.; MROZ, Z. REBEL, J. M. J.; HUURNE, A. A. H. M. Parameters and techniques to determine intestinal health os Poultry as constituted by immunity,,integrity and functionality. **Current Issues of Intestinal Microbiology**, v. 3, p. 1-14, 2002.

JOEGER, R.D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. **Poultry Science**, n. 82, p. 640-647, 2003.

JUNQUEIRA, O.M.; SILZ, L.Z.T.; LIM, F.R.; MORETTI, A.D.S.; ARAUJO, L.F. **Substituição da proteína do leite em pó desnatado pelo isolado protéico de soja sobre características morfológicas intestinais de leitões no período de 21 a 35 dias de idade**. Jaboticabal, 2002. Disponível em: <<http://www.sian.info.br/porcinos/publicaciones/viencuent/mack.htm>>. Acesso em: 21 maio 2007.

JURICOVA, H.; VIDENSKA, P.; LUKAE, M.; FALDYNOVA, M.; BABAK, V.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Influence of *Salmonella enteric* Serovar Enteritidis infection on the development of the cecum microbiota in newly hatched chicks. **Applied and Environmental Microbiology** v.79, n. 2, 2012.

KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCER, A.; KLOTERHALFEN, B.; SCHUMPELICK, V.A. Simple method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical Expertise Medical** v. 2, p.131-135, 2002.

KONEMANN, E.W.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C.; **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LEANDRO, N. S. M.; OLIVEIRA, A. S. C.; GONZALES, E.; CAFÉ, M. B.; STRINGHINI, J. H.; ANDRADE, M. A. Probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados. 1. Desempenho de pintos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 39 n. 7 p.1509-1516, 2010.

LEE, K.; LILLEHOJ, H. S.; SIRAGUSA, G. R. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **Japan Poultry Science Association** v. 47 p. 106-114, 2010.

LEI, X. J.; RU, Y. J.; ZHANG, H. F. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* based direct-fed microbials and antibiotic on performance, nutrient digestibility, cecal microflora, and intestinal morphology in broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 23, p. 486 – 493, 2014.

LEI, X.; PIAO, X.; YINGJUN, R.; ZHANG, H.; PÉRON, A.; ZHANG, H. E. . Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* based direct-fed microbials on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. **The Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.28, n.2, p. 239-246, 2015.

LI, S. P.; ZHAO, X. J.; WANG, J. Y. Synergy of Astragalus polysaccharides and probiotics (Lactobacillus and Bacillus cereus) on immunity and intestinal microbiota in chicks. **Poultry Science**, v. 88, p. 519-525, 2009.

LIMA, A. C. F.; PIZAULO JR., J. M.; MACARI, M.; MALHEIROS, E. B. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p. 200-207, 2003.

LIN, S. Y.; HUNG, A. T. Y.; LU, J. J. Effects of supplement with different level of *Bacillus coagulans* as probiotics on growth performance and intestinal microflora populations of broilers chickens. **Journal of Animal and Veterinary Advances** v. 10, n. 1, p.111-114, 2011.

LOURENÇO, M. C.; KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; MUNIZ, E.; PUCKLER, L.; SANTIN, E. Effect of *Bacillus subtilis* in the dynamics of infiltration of immunological cell in the intestinal mucosa of chickens challenged with *Salmonella* Minnesota. **International Journal of Poultry Science** v. 11 n. 10 p. 630-634, 2012.

LOURENÇO, M. C.; KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; MIGLINO, L. B.; PICKLER, L.; KRAIESKI, A. L.; SANTIN, E. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, p. 11-14, 2013.

MALLINSON, E.T.; SNOEYENBOS, G.H. Salmonellosis. In: PURCHASE, H.G.; ARP, H.L.; DOMERMUTH, H.C. et al. (Eds.) **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 3.ed. American Association of Avian Pathologists, p.3-11, 1989.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, Chapecó, **Anais**. 2004. p. 119-129.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-autorizados>>. Acesso 12 out 2015.

MENCONI, A.; WOLFENDEN, A. D.; SHIVARAMAIAH, S.; TERRAES, J. C.; URBANO, T.; KUTTEL, J.; KREMER, C.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Hedeilberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. **Poultry Science**, v. 90, p. 561-565, 2011.

NOURI, M.; RAHBARIZADEH, F.; AHMADVAND, D.; MOOSAKHANI, F.; SADEQZADEH, E.; LAVASANI, S.; VISHTEH, V. K. Inhibitory effects of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus crispatus* isolated from chicken gastrointestinal tract on *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* growth. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, 2010.

NOVIER, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 562-568, 2004.

O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **European Molecular Biology Organization**, v. 7, p. 688-693, 2006.

OTUTUMI, L. K.; PREVIATO DO AMARAL, P. F. G.; PIAU JR, R.; MOURA, D. J.; CARVALHO, T. M. R. Efeito de microrganismos benéficos no tratamento de cama de frango. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 16, n. 2, p. 121-127, 2013.

PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 3 ed. Ed. Nova Guanabara, 2002.

PEDROSO, A. A. **Estrutura da comunidade de Bactérias do trato intestinal de frangos suplementados com promotores de crescimento**. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia: Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A. S.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, E. A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, p. 125-134, 2003.

RAMOS, L. S. N. **Aditivos alternativos a antibióticos em rações para frangos de corte**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí. Brasil.

RAMOS, L. S. N.; LOPES, J. B.; SILVA, S. M. M.; SILVA, F. E. S.; RIBEIRO, M. N. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.8, p.1738-1744. 2011.

REYES, PÉRES E PÉRES, H. S. R.; PÉREZ, M.; PÉREZ, M. L. et al. Efectos de la aplicación de bacterias lácticas y ácido láctico en la ganancia de peso y mortalidad en pollos. **Revista Científica – Facultad de Ciencias Veterinarias**, v. 10, n. 4, p. 310-314,, 2000.

ROLL, V. F. B.; LOPES, L. L.; GONÇALVES, F. M.; ANCIUTI, M. A.; LEITE, F. L.; CORREA, E. K.; XAVIER, E. G. **Broiler breeder microbiological litter condition following treatment with Impact P®**. *Ciência Rural*, v. 38, n. 9, p. 2650-2653, 2008.

SAS INSTITUTE. Software and services: system for Windows, version 8.0 software Cary, 2002.

SEN, S.; INGALE, S. L.; KIM, Y. W.; KIM, J. S.; KIM, K. H.; LOHAKARE, J. D.; KIM, H. S.; RYU, M. H.; KWON, I. K.; CHAE, B. J. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutriente retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 264-268, 2012.

SILVA, C. R. **Uso de probiótico em rações de frangos de corte: desempenho, digestibilidade e energia metabolizável**. 2009. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

SOUZA, V. L. **Desempenho e utilização de nutrientes por vacas leiteiras suplementadas com *Bacillus subtilis***. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

SUPRIYATI, T.; HARYATI, T.; SUSANTI, T.; SUSANA, I.W.R. Nutritional value os rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingrediente for broiler chickens. **Asian Australas Journal of Animal Science**. v. 28, n. 2, p. 231-238, 2015.

TRALDI, A. B.; OLIVEIRA, M. C.; RIZZO, P. V.; MORAES, V. M. B. Desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com ração contendo probiótico e criados sobre cama nova ou reutilizada. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10 n. 1, p. 107-114, 2009.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório Anual 2014**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>> , Acesso em 04 Ago 2015.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 1097-1104, 2007.

WADUD, S. A.; MICHAELSEN, E. G.; PARCSI, G.; ZEMB, O.; STUETZ, R.; MANEFIELD, M. Bacterial an fungal community composition over time in chicken litter with high or low moisture content. **British Poultry Science**. v. 53, n.5, p. 561-569, 2012.

ZHANG, Z. F.; CHO, J. H.; KIM, I. H. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO₂ on growth performance, relative imune organ weigth, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. **Livestock Science**. v. 155, p. 343 – 347, 2013.